

GOVP1200134180

664.024

L 293 6

19

최 종
연구보고서

**배초향을 이용한 면역조절 기능소재 개발 및
기능성 식품 응용 연구**

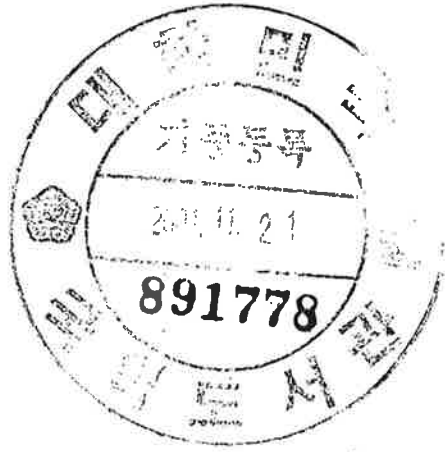
Development of Immunomodulators and Applications
for Functional Foods from Baechohyang (*Agastache rugosa*)

배초향을 이용한 면역조절물질 개발연구
Development of Immunomodulators form Baechohyang
(*Agastache rugosa*)

배초향을 이용한 기능성 식품 응용연구
Applications of Baechohyang (*Agastache rugosa*)
for Functional Foods

**한국생명공학연구원
한국식품개발 연구원**

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “배초향을 이용한 면역조절 기능소재 개발 및 기능성 식품 응용 연구” 과제 (제1 세부과제 “배초향을 이용한 면역조절물질 개발연구”, 제2 세부과제 “ 배초향을 이용한 기능성 식품 응용연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 10 월

주관연구기관명 : 한국생명공학 연구원

총괄연구책임자 : 오 세량

세부연구책임자 : 오 세량

연 구 원 : 이 형규

연 구 원 : 안 경섭

연 구 원 : 오 구택

연 구 원 : 홍 정주

연 구 원 : 최 순자

연 구 원 : 김 정희

협동연구기관명 : 한국식품개발연구원

협동연구책임자 : 김 경탁

연 구 원 : 홍 회도

연 구 원 : 이 부용

연 구 원 : 최 현선

요 약 문

I. 제 목

배초향을 이용한 면역조절 기능소재 개발 및 기능성 식품 응용 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

면역반응이 과도하게 활성화되어 나타나는 과민성 질환이나 만성 염증 등 난치성 질환에는 현재 특별한 치료제가 개발되어 있지 못하여 대개 대중적인 치료약물을 반복 사용하거나 기존 약물을 혼용 및 교체하면서 사용하는 실정이다. 이러한 질환에는 장기적으로 체질개선이나 질환수정의 방법 등으로 예방 및 치료하는 것이 효과적인 방법이라 할 수 있으며, 면역 질환과 관련 있는 다양한 성인병 (동맥경화, 고혈압, 뇌졸중 등 심혈관계 질환, 알츠하이머성 치매, 노화 등) 또한 식이요법에 의한 꾸준한 예방 관리가 필요하다. 따라서, 장기적으로 복용하여도 안전한 천연자원을 대상으로 면역 질환에 유효한 생리활성 물질을 규명하고 이들을 함유한 기능성 식품의 개발하는 것은 면역질환 및 이와 관련된 질환의 예방과 치료에 효과적인 방법이라 할 수 있다.

그동안 천연물을 대상으로한 연구는 의학분야가 주도적으로 이끌어 왔으며 자원에 대한 인식은 기능성 물질을 함유하는 재료 정도에 그치고 있다. 따라서 연구 대상을 선정할 때 희귀하거나 재배가 어려운 자원을 선정하기보다는 손쉽게 재배할 수 있고, 식용, 생약재로서 일반인들의 관심 대상이 되게 하여 생산물 자체의 부가가치를 높일 수 있는 자원을 선택하는 것이 중요하며, 농가에 재배할 동기를 부여함으로써 농민의 소득원으로 이용할 수 있게 하는 연계의식이 필요하다.

배초향 (排草香, *Agastache rugosa*, Labiatae)은 예로부터 한방에서 지상부 (藿香), 지하부 (藿香根), 정유 (藿香露) 등 전 부위를 생약재로 사용하고 있고, 민간에서는 잎을 풍미재료로, 꽃을 밀원 (蜜源)으로 이용하는 등 전 식물부위를 약용 및 식용으로 사용하고 있어 장기적으로 복용하여도 안전성이 확인된 토착식물이며, 생리활성 성분에 대한 연구결과를 곧바로 산업용 자원으로 활용할 수 있는 농산 자원이다.

본 연구에서는 다양한 면역관련 탐색계 및 동물실험으로 배초향의 면역조절 활성물질을 규명하고 활성에 근거한 기능성 식품을 개발하여 배초향의 부가가치를 높임으로서 재배농가의 소득증가와 관련산업의 활성화에 긍정적인 기여를 하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

연구개발의 내용은 크게 두가지로 진행하였다. 먼저 제 1 세부과제의 연구 내용은 기능성 식품으로 사용할 배초향 지상부를 대상으로 다양한 항염 탐색계에서 활성 검색, 활성물질의 분리 및 구조동정, 주 활성성분에 대한 동물실험을 수행하여 배초향 추출물의 면역계 및 이와 관련된 질환에 대한 생리활성을 규명하고자 하였다. 연구개발 범위는 1차년도에 배초향 추출물 제조 및 분획별 항염증 탐색을 수행하고 2차년도에는 배초향의 면역조절 활성물질의 구조 분석과 활성-구조 관계를 연구하며 3차년도에서는 동물모델을 이용한 항염 활성과 염증관련 생리활성을 연구하였다. 제 2 세부과제에서는 배초향 부위 별 및 추출물을 이용하여 식품 개발에 필요한 기초 및 응용연구를 수행하고 활성과 연계된 다양한 기능성 식품을 개발하고자 하였으며, 연구개발 범위는 1차년도에 식품소재활용을 위한 적정 전처리 기술과 활성과 수율을 고려한 추출 최적공정을 확립하고, 2차년도에 배초향 활성물질 함유 농축액을 이용한 기능성 음료 개발, 3차 년도에는 배초향 전초를 이용한 차류 및 향신료 개발 제조공정 확립을 위한 연구를 하였다. 따라서 본 연구는 배초향 추출물 및 성분의 면역조절 활성을 규명하고 이에 근거한 다양한 식품

을 개발하여 과학적 근거를 가진 기능성 식품을 개발하는데 그 목적을 두었다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

1. 연구 개발 결과

1) 배초향 추출물의 항염 및 항동맥경화 활성

배초향 추출물은 급성염증 동물모델에서 항염 활성과 고지혈증 유발 동물모델에서 항동맥경화 활성을 나타내었으며, 이러한 *in vivo* 활성은 배초향의 주 성분들이 항보체 활성 [불포화지방산 (oleic acid, linoleic acid, linolenic acid), phytosterols (campesterol 4.1%, stigmasterol: 5.8%, β -sitosterol : 90.1%), oleanolic acid 및 rosmarinic acid)과 ICAM-1 발현 저해활성 (불포화지방산류, acacetin, tilianin 등 flavonoid)의 경로에 근거하였음을 *in vitro* 탐색계에 대한 활성으로 제시하였다. 그리고, 배초향 추출물은 고지혈증 동물모델에서 8주간 1%수준으로 사료에 투여하였을 때 동맥경화성 병변이 대조구에 비하여 46.6% ($p < 0.01$) 감소한 결과를 나타내어 배초향 추출물의 항염증 활성에 기인한 항동맥경화 활성을 최초로 규명하였다. 본 연구 결과로서 배초향 추출물의 항염 및 항동맥경화성 활성을 특허출원 (출원번호 2001-39574)하였다.

2) 티리아닌의 항염 및 항동맥경화 활성

배초향의 주성분 (2% of total extract)인 tilianin은 ICAM-1, VCAM-1, NO, iNOS, IL-6 등 다양한 염증인자의 발현 및 생성을 억제하는 활성을 나타내어 배초향 추출물의 항염활성을 나타내는 대표적 활성성분임을 규명하였다. 그리고 고지혈증 동물모델에서 8주간 1%수준으로 사료에 투여하였을 때 동맥경

화성 병변이 대조구에 비하여 41.9% ($p < 0.003$) 감소한 결과를 나타내어 배초향 추출물의 항동맥경화 활성 발현의 주성분임을 최초로 규명하였다. 본 연구 결과로서 배초향 추출물의 항염 및 항동맥경화성 활성을 특허출원 (출원번호 2001-39575)하였다.

3) 배초향 추출물을 이용한 기능성 음료 및 향신료

배초향 추출물을 이용한 기능성 음료 제조 연구에서 추출 조건, 첨가물 배합비, 저장 조건 등을 확립하여 기능성 혼합음료, 과립차 및 탄산음료 개발공정을 확립하였으며 본 연구결과를 특허출원 (2001-25172)하였다. 배초향 추출물을 이용한 향신료 개발 연구에서는 추출 조건, 용도별 향신료 배합비, 포장방법 등을 확립하여 향신료 개발공정을 확립하였으며 본 연구결과를 특허출원 (2001-25217)하였다.

4) 배초향 잎을 이용한 후리가게 및 엽차

배초향 전초를 이용한 식품개발 연구에서 잎을 이용한 엽차 개발연구에서 엽차 및 혼합차의 개발 공정을 확립하여 특허출원 (2001-25173)하였으며, 잎을 이용한 후리가게 개발연구에서 잎의 전처리, 다양한 조미료 배합비를 토대로 용도별 후리가게 개발공정을 확립하여 이를 특허출원 (2001-25216)하였다.

2. 활용에 관한 건의

이상의 연구결과로서 배초향 추출물 및 잎을 이용한 기능성 식품의 개발에 필요한 과학적 근거와 개발공정을 확립하였다. 본 연구 성과물을 토대로 배초향의 의약품 소재 개발 및 기능성 식품 산업화를 추진하여 배초향의 부가 가치를 제고함으로써 재배농가의 소득증대와 관련 산업의 활성화에 기여하고자 한다.

SUMMARY

I. Title of the Study

Development of Immunomodulators and Applications for Functional Foods from Baechohyang (*Agastache rugosa*)

II. Objective and Significance of the Study

Allergy and chronic inflammatory diseases caused by excessive immune responses is known to be not easily curable diseases. Because the effective pharmaceuticals for them have not been definitely developed yet, the patients have to use various kinds of allopathic remedies. For protection against diseases caused by abnormal immune system and a lot of adult diseases related in inflammation such as atherosclerosis, hypertension, stroke, Alzheimer's disease and aging, it is a effective method to improve his own physical conditions by neutraceuticals, which contain active compounds on modulation of immune system and are safe for a long-period use. Natural products has been important resources for pharmaceuticals. In the research for neutraceuticals from plants, it is necessary to select an object which contains active compounds as major components and can be easily cultivated. The plants for neutaceuticals can lead out to culture and be a good source of income for farmers.

Baechohyang (*Agastache rugosa*, Labiatae) has been used for traditional medicine, spices and source of honey in Korea. Thus this plant is a good candidate for neutraceuticals. In this study, we investigate the active compounds for immuno-modulating activity in

vitro and *in vivo* from baechohyang extract and develop various kinds of functional foods based on the physiological activities. The results could encourage farmers to cultivate it and contribute positively to industrial developments.

III. Scope of Research

The scope of the research is summarized in the following two categories. In the first subject of research, investigation of immuno-modulating activities of Baechohyang extract was performed through the screening active constituents using *in vitro* assays and evaluating anti-inflammatory activity and anti-atherosclerotic activity of the extract and active compound (tilianin) *in vivo*. Evaluation of anti-inflammatory activities of the extract and subfractions from Baechohyang was carried out in the first year, isolated active constituents from it and investigated structure-activity relationship in the second year, and anti-inflammatory and anti-atherosclerotic activity of the extract and active compounds was evaluated by using animal models in the third year. In the second subject of research, development of functional foods using the extract and whole plant: processes of elementary pre-treatment conditions were set up in the first year, optimal processes for beverages contained Baechohyang extract such as drinks and granule tea were established in second year, and optimal processes for leaf tea and spices were established in the third year. In this study was aimed to reveal the scientific evidence of Baechohyang as a source of nutraceuticals and to development industrial processes for functional foods.

IV. Results and Further Application

1. Results

- 1) **Anti-inflammatory activity and anti-atherosclerotic activity of Baechohyang extract:** The extract showed strong anti-inflammatory activity in carrageenan-induced acute edema mouse model and anti-atherogenic lesion activity in LDLR (low density lipoprotein receptor) deficient mouse model. These activities were thought to be resulted from modulation activity of several pathways of inflammation process. Among the main constituents of Baechohyang, polyunsaturated fatty acids (PUFA), phytosterols, oleanolic acid and rosmarinic acid showed potent anticomplementary activity, and PUFA, acacetin and tilianin newly showed potent ICAM-1 expression inhibition activity. We applied for a patent (application no 2001-39574) with this results.

- 2) **Anti-inflammatory activity and anti-atherosclerotic activity of tilianin from Baechohyang:** Tilianin, the major constituent of Baechohyang, showed strong anti-inflammatory activity against ICAM-1, VCAM-1, NO synthesis and iNOS & IL-6 mRNA expression *in vitro*, and diminished the atherogenic lesions in LDLR^{-/-} mouse model. We applied for a patent (application no 2001-39575) with this results.

- 3) **Functional beverages and spices using the extract of Baechohyang:** The processes of extraction, mixing ratio of additives and storage conditions were established for drinks and granule tea. This results were applied for a patent (application no 2001-25172). And the processes of extraction conditions, optimal mixing ratio for spices

were also established and this results were applied for a patent (application no 2001-25217).

4) **Leaf tea and Furigake using Baechohyang leaves:** The processes for leaf tea and mixed tea using baechohyang leaves were established and the results were applied for a patent (application no 2001-25216). And the processes for development furigake using the leaves were also established and the results were applied for a patent (application no 2001-25216).

2. Further application

From this study scientific evidences of Baechohyang as a strong candidate of nutraceuticals and industrial processes for functional foods were established. We would like to elevate the value of Baechohyang for cultivating farmers through the development functional foods of Baechohyang in the near future.

CONTENTS

Preface -----	1
Summary (in Korean) -----	2
Summary -----	6
Content -----	10
Contents(in Korean) -----	12
Chapter 1. Introduction -----	14
section 1. Objectives of the study -----	14
section 2. Significance of the study -----	15
Chapter 2. Development of immunomodulators from Baechohyang -----	17
section 1. Introduction -----	17
section 2. Materials and Methods -----	21
2-1. Solvent fractionation and isolation from Baechohyang extract -----	21
2-2. <i>In vitro</i> screening methods -----	22
2-3. <i>In vivo</i> anti-inflammatory activity -----	32
2-4. <i>In vivo</i> anti-atherosclerotic activity -----	32
section 3. Results and Discussion -----	33
3-1. Anticomplementary compounds -----	33
3-2. Inhibitors against ICAM-1 expression -----	40
3-3. PAF antagonistic activity -----	42
3-4. NO synthesis inhibition activity -----	44
3-5. Anti-inflammatory activity of Baechohyang extract <i>in vivo</i> -----	46
3-6. Anti-atherosclerotic activity of Baechohyang extract <i>in vivo</i> -----	47
section 4. Conclusion -----	52
Chapter 3. Applications of Baechohyang for functional foods -----	53
section 1. Introduction -----	53

section 2. Materials and Methods	-----	55
2-1. Pre-treatment for functional foods	-----	55
2-2. Process of funtional beverages using Baechohyang extract	--	58
2-3. Process of granule tea	-----	59
2-4. Process for Baechohyang leaf teas	-----	59
2-5. Process of mixed tea using with additives	-----	60
2-6. Process for spices using Baechohyang extract	-----	60
2-7. Process for furigake using Baechohyang leaves	-----	61
section 3. Results and Discussion	-----	62
3-1. Investigations Baechohyang for funtional foods	-----	62
3-2. Functional beverages using Baechohyang extract	-----	73
3-3. Process of granule tea	-----	88
3-4. Process for Baechohyang leaf teas	-----	88
3-5. Process of mixed tea using with additives	-----	94
3-6 Spices using Baechohyang extract	-----	98
3-7. Furigake using Baechohyang leaves	-----	105
section 4. Conclusion	-----	117

목 차

제출문 -----	1
요약문 -----	2
SUMMARY -----	6
CONTENTS -----	10
목차 -----	12
제1장 서론 -----	14
제1절 연구개발 목적과 범위 -----	14
제2절 연구개발의 중요성 -----	15
제2장 배초향을 이용한 면역조절물질 개발연구 -----	17
제1절 서설 -----	17
제2절 재료 및 방법 -----	21
2-1. 배초향 추출물의 용매 분획 및 물질분리 -----	21
2-2. <i>In vitro</i> 항염증 탐색 -----	22
2-3. <i>In vivo</i> 항염 활성화 -----	32
2-4 <i>In vivo</i> 항동맥경화 활성화 -----	32
제3절 결과 및 고찰 -----	33
3-1. 항보체 활성화물질 -----	33
3-2. 세포부착물질 발현 저해활성 물질 -----	40
3-3. PAF 길항 활성화 -----	42
3-4. NO 생성 저해 활성화 -----	44
3-5. 배초향 추출물의 <i>in vivo</i> 항염활성 -----	46
3-6. 배초향 추출물의 <i>in vivo</i> 항동맥경화활성 -----	47
제 4절 결론 -----	52
제 3장 배초향을 이용한 기능성 식품 응용연구 -----	53
제1절 서설 -----	53
제 2절 재료 및 방법 -----	55

2-1. 기능성 식품을 위한 전처리 -----	55
2-2. 배초향 추출물을 이용한 기능성 음료 제조 공정 -----	58
2-3. 과립차류 제조 공정 -----	59
2-4. 엽차류 개발을 위한 제조공정 -----	59
2-5. 부재료를 혼합한 배초향 혼합차의 제조 -----	60
2-6. 배초향을 이용한 미립형 향신료 제조 공정 -----	60
2-7. 배초향 전초를 이용한 후리가게 제조 공정 -----	61
제3절 결과 및 고찰 -----	62
3-1. 배초향의 기능성 식품을 위한 기초조사 -----	62
3-2. 배초향 추출물을 이용한 기능성 음료 -----	73
3-3. 배초향 과립차 제조 -----	88
3-4. 배초향 잎을 이용한 엽차 -----	88
3-5. 부재료를 혼합한 배초향 혼합차 제조 -----	94
3-6. 배초향 추출물을 이용한 향신료 -----	98
3-7. 배초향 전초를 이용한 후리가게 -----	105
제4절 결론 -----	117

본 문

제1장 서론

제1절 연구개발 목적과 범위

본 연구는 다양한 면역관련 탐색계 및 동물실험으로 배초향의 면역조절 활성물질을 규명하고 활성에 근거한 기능성 식품을 개발하여 배초향의 부가가치를 높임으로서 농가의 소득증가와 관련산업의 활성화에 그 목적을 두고 수행하였다.

연구개발의 내용은 크게 두 가지로 진행하였다. 먼저 제 1 세부과제에서는 기능성 식품으로 사용할 배초향 지상부를 대상으로 다양한 항염 탐색계에서 활성 검색, 활성물질의 분리 및 구조동정, 주 활성성분에 대한 동물실험을 수행하여 배초향 추출물의 면역계 및 이와 관련된 질환에 대한 생리활성을 규명하고자 하였다. 연구개발 범위는 1차년도에 배초향 추출물 제조 및 분획별 항염증 탐색을 수행하고 2차년도에는 배초향의 면역조절 활성물질의 구조 분석과 활성-구조 관계를 연구하며 3차년도에서는 동물모델을 이용한 항염 활성과 염증관련 생리활성을 연구하였다. 제 2 세부과제에서는 배초향 부위 및 추출물을 이용하여 식품 개발에 필요한 기초 및 응용연구를 수행하고 활성과 연계된 다양한 기능성 식품을 개발하고자 하였으며, 연구개발 범위는 1차년도에 식품소재화를 위한 적정 전처리 기술과 활성과 수율을 고려한 추출 최적공정을 확립하고, 2차년도에 배초향 활성물질 함유 농축액을 이용한 기능성 음료 개발, 3차 년도에는 배초향 전초를 이용한 차류 및 향신료 개발 제조공정 확립을 위한 연구를 하였다.

제2절 연구개발의 중요성

1987년 물질특허제 전면 실시로 인하여 원천 기술이 거의 없었던 우리로서는 물질 특허 로얄티가 80년대 2-3%에서 최근 7-8%로 증가하고 있고 '95년부터 실시한 WTO체제하에서는 단순 기술 도입으로 경쟁력을 확보하는 것이 어려운 상황이므로, 앞으로의 연구 방향은 우리만의 독자적인 신기술이나 외국의 신기술에 대응할 방어 또는 대체 기술을 확보하는 것이 절실히 요구되고 있다. 따라서 국내 부존자원을 이용한 기능성 물질 탐색 연구는 자원의 효율적 이용뿐 아니라 독자적인 개발기술을 확보할 수 있는 방법이다. 현재 이러한 취지에서 국내에서도 생약자원으로부터 생리활성 물질 탐색 연구가 활발히 진행되고 있으나 식용 또는 생약자원으로서 재배 가치를 부여하고 정확한 생리활성을 근간으로하는 기능성 식품을 개발하는 연계가 미흡한 실정이다. 그동안 천연물을 대상으로한 연구는 의약분야가 주도적으로 이끌어 왔으며 자원에 대한 인식은 기능성 물질을 함유하는 재료 정도에 그치고 있다. 따라서 연구 대상을 선정할 때 희귀하거나 재배가 어려운 자원을 선정하기보다는 손쉽게 재배할 수 있고, 식용, 생약재로서 일반인들의 관심대상이 되게 하여 생산물 자체의 부가가치를 높일 수 있는 자원을 선택하는 것이 중요하며, 농가에 재배할 동기를 부여함으로써 농민의 소득원으로 이용할 수 있게 하는 연계의식이 필요하다.

배초향 (排草香, *Agastache rugosa*, Labiatae)은 예로부터 한방에서 지상부 (藿香), 지하부 (藿香根), 정유 (藿香露) 등 전 부위를 생약재로 사용하고 있고, 민간에서는 잎을 풍미재료로, 꽃을 밀원 (蜜源)으로 이용하는 등 전 식물부위를 약용 및 식용으로 사용하고 있어 장기적으로 복용하여도 안전성이 확인된 토착식물이며, 생리활성 성분에 대한 연구결과를 곧바로 산업용 자원으로 활용할 수 있는 농산 자원이다. 배초향 추출물로부터 직접 활성 검색을 통한 면역조절 기능성 물질을 비롯한 다양한 활성물질을 연구한 사례나 배초향을 이용한 기능성 식품을 개발한 사례가

없는데, 본 연구로서 배초향의 면역조절 활성화에 근거한 기능성 식품 개발 기술을 확립하면 배초향의 부가가치를 제고할 수 있어 재배농가의 소득증가를 기대할 수 있고 이와 함께 농산물의 가공개발 기술 등 관련산업의 활성화에 큰 파급 효과를 나타낼 수 있다.

제 2장 배초향을 이용한 면역조절물질 개발연구

제 1절 서설

염증반응은 조직 (세포)의 손상이나 외부감염원 (박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)에 감염되었을 때 국소 혈관과 체액 중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종 발열 통증 등 외적 증상이 나타난다. 정상인 경우 염증반응은 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체 기능회복작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나 내부물질이 원인이 되어 염증반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 오히려 질환의 주요 병리현상(과민성 질환, 만성 염증)이 되며, 수혈, 약물투여, 장기이식 등 치료과정에서도 장해요인이 된다. 본 연구에서는 보체계 (complement system), 세포부착물질 (CAM, cell adhesion molecules: ICAM-1, VCAM-1), 산화질소 (nitric monooxide, NO) 등의 염증매개 인자를 대상으로 배초향의 면역조절 기능성을 규명하고자 하였으며, 이들 염증매개 인자들의 면역계의 역할을 살펴보면 다음과 같다.

먼저, 보체계 (complement system)는 면역반응의 초기에 염증 활성화 및 증폭작용을 하는 체액성 주요인자이다. 보체의 활성화 과정에서 생성되는 활성단백질(아나필라톡신류: C3a, C4a, C5a)과 복합단백질(membrane attack complex, MAC)은 다양한 염증 질환[류마치스성 관절염 (Sato, Y. et al, Ann. Rheum. Dis. 52, 795-800, 1993), 전신흡반성낭창 (Takematsu, H. et al, Clin. Exp. Rheumatol. 10, 433-438, 1992), 성인호흡기질환 증후군 (Langlois, P. F. et al, Heart Lung. 18, 71-84, 1989), 알츠하이머성 치매 (McGeer, D. L. et al, 8, 80-83 1995)와 관련이 있으며, 장기이식 초급성 거부반응의 직접적인 원인이 되고 있다. (White, D. 14, 3-5, 1996)

혈소판 활성화인자 (platelet activating factor, 이하 PAF)는 세포 인지

질에서 유래한 에테르형 인지질 화합물로서 모든 염증세포, 혈관내피세포 및 혈소판에서 생산되는 염증매개인자이다. PAF는 $10^{-9} \sim 10^{-10}$ M 정도의 저농도에서도 혈관투과성 증대, 염증 세포의 활성화 작용을 하여 염증세포의 다른 매개물질 합성 및 방출을 유도함으로써 급성염증반응을 유발하는 매개인자이다. PAF의 염증반응 활성화로 인한 병리적 반응으로는 기관지 수축 및 과민반응으로 인한 천식 유발작용이 대표적이며, 조직이식 거부반응, 심장의 anaphylaxy, 내독소에 의한 쇼크, 위궤양, 급성 알러지반응, 과민성 피부염 등 다양한 질병과 깊은 관련이 있는 것으로 보고되었다

ICAM-1은 내피세포 (endothelial cells) 표면에서 발현되는 세포부착물질군의 대표적인 단백질이다. 정상적인 경우 매우 낮은 수준으로 발현되어 있으나 TNF- α , 인테페론- γ , 인터루킨- 1β 등 사이토카인류 염증매개물질에 의하여 자극을 받으면 발현량이 급속히 증가되어 혈류 중 이동하는 단핵구나 임파구 등 염증세포를 부착하고 염증세포가 염증발생 조직으로 이동하는데 역할을 한다. [Wegner C. D. et al, Science, 247(1941), 456-459, 1990; Dustin, M. L. et al, J. Immunol. 137(1) 245-254, 1986] 따라서, ICAM-1의 발현은 염증세포가 염증발생 부위로 이동 및 집속하는 초기에 작용하여 염증반응의 증폭작용에 중요한 작용을 한다.

NO는 NO 합성효소 (nitric oxide synthase, 이하 NOS)에 의해 L-알지닌 (L-arginine)이 산화된 후 L-시트룰린 (L-citrulline)과 함께 생성된다. NO는 혈관계에 작용하여 혈관확장, 혈소판 부착 및 응집, 신경전달, 소화기관 운동, 음경발기 등에 관여하는 매개물질이며, 염증세포 뿐만 아니라 비면역 세포에서도 생성되어 미생물 감염에 대한 방어작용을 한다. 한편, NO 생성에 관여하는 NOS 중 하나인 유도형-NOS (inducible-NOS, 이하 iNOS)는 칼슘이나 칼모듈린 (calmodulin)에 비의존성으로서 지방다당질 (lipopolysaccharide, 이하 LPS), 사이토카인류 (IFN- γ , TNF 등)의 자극으로 발현되는데 (Dinerman, J. L. et al, Circ. Res. 73, 217-222, 1993), 이러한 자극에 의하여 사이클로옥시게네이스-2 (cyclooxygenase-2, 이하 COX-2)도 함께 활성화되어 염증매개물질인 프로스타글란딘류 (prostaglandins, 이하 PGs)가 생성되기 때문에 iNOS

발현과 COX-2의 발현은 매우 밀접한 관련이 있으며, 생성된 NO는 COX-2 발현에 영향을 주기도 한다. (Robert C. et al, J. Immunol. 165, 1582-1587, 2000; Daniela S. et al, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 90, 7240-7244, 1993) 대식세포에서 NO의 생성은 선택적으로 iNOS의 발현에 의해서 유발되며, 그 결과 역시 다른 염증반응의 활성화를 유발하기 때문에 NO는 염증 질환의 중요한 인자라고 할 수 있다. (Heirholzer, C. et al, J. Exp. Med. 187, 917-928, 1998; Nussler A. K. et al, J. Leukocyte Biol. 54, 171-178, 1993)

한편, 동맥경화는 지질대사와 관련된 유전적 요인과 식습관, 흡연, 운동부족 등 환경 요인에 의하여 동맥이 경화되는 질환으로서, 이로 인하여 심장질환, 뇌혈관 질환 등의 순환계 질환의 원인이 된다. 동맥경화의 초기 발생에 관한 가설은 “손상에 대한 반응 (response-to-injury hypothesis)”으로서, 유전적 변이, 과산화물, 고혈압, 당뇨, 혈장 호모시스테인 농도 증가, 미생물 감염 등의 원인에 의하여 혈관 내피세포가 정상적인 항상성을 유지하지 못하는 기능부전 상태가 되는 것이다. 내피세포가 기능부전 상태로 되면 세포부착물질이 크게 발현되고 세포 투과성이 증가되어 혈중 면역세포, 혈소판, 지방질 등의 부착 및 조직으로의 투과성이 증가되며, 이들 면역세포들의 염증매개인자 및 성장인자 분비 등 염증반응 때문에 동맥경화성 병변이 발생 및 발달하게 된다는 것이다 (Russel R., New England J. of Med. 340(2), 115-126, 1999) 이때, 혈중 저밀도 지단백질 (low density lipoprotein, 이하 LDL)이 산화, 당결합, 집적화, 당단백 결합 등의 원인으로 변형-LDL (modified-LDL, 이하 MLDL)이 생성되고, 이들은 혈관 내피세포 및 평활근의 자극 및 손상을 유발한다. (Steinberg D., J. Biol. Chem. 272, 20963-20966, 1997; Griendling K.K. et al., Circulation 96, 3264-3265, 1997; Bavab M. et al, Artherosler. Thromb. Vasc. Biol. 16, 831-42, 1996) 이로 인하여, 내피세포의 혈관세포부착물질-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 발현 및 염증세포의 염증매개인자 방출이 촉진되면 LDL은 내피세포 아래에 유입 및 축적이 되고, 축적된 LDL 및 산화된 MLDL은 다시 대식세포, T 임파구 등 면역세포의 유입 및 활성화를 유발하는 과정을 되풀이하여 병변의 염증반응을 촉진하게 된다.

(Rajavashisth T.B. et al., Nature, 344, 254-257, 1990; Quinn M. T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2995-2998, 1987) 그 후, 병변으로 유입된 대식세포나 임파구로부터 방출된 가수분해효소, 염증매개인자, 성장인자 등의 작용으로 병반은 괴사하게 되고, 괴사된 병소 부위로 단핵구의 유입, 평활근의 이동 및 분화, 섬유성 조직의 형성 등의 반복적인 과정을 통하여 병변 조직은 MLDL을 핵으로 한 괴사조직에 섬유질이 덮인 복잡한 구조의 섬유질 병변으로 발달하게 되며 (Fuster V. et al. eds. Artherosclerosis and coronary artery disease. vol. 1, 539-555; 585-594; vol. 2, 492-510, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996), 발달된 병변 조직으로부터 혈전이 생성되고 동맥이 경화되어 혈류장애 등 순환기 질환이 나타나게 되는 것이다. (Russel R., New England J. of Med. 340(2), 115-126, 1999; Wong, M.-L. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(15), 8681-8686, 2000) 따라서, 동맥경화는 혈중 콜레스테롤 및 LDL 등 지방질의 함량이 높을 경우 발생하게 되지만, 단순한 지방질 축적에 의해서만 발생하는 것이 아니라 동맥 내피세포 아래로 지방질의 유입 및 축적되는 과정과 그 후 일어나는 병변의 발달 및 세포괴사에 이르는 일련의 과정이 내피세포, 대식세포 및 임파구 등이 관여하는 전형적인 염증 반응인 것이다.

한편, 배초향 (排草香, *Agastach rugosa* O. Kuntze)은 순형과(Labiatae)에 속하는 다년생 초본으로서 한국, 중국, 일본 등 동북아에 분포하고 있으며 우리나라에서는 주로 남부 지방에 야생하거나 일부 재배되고 있다. 한방에서는 지상부를 곽향(藿香)이라 하며 명의별록(名醫別錄)에는 “풍수독종을 치료하고 나쁜 기(氣)를 제거하며 곽란, 속이 쓰리고 아픈 증상을 치료”하는 약재로 사용하고 있으며, 민간에서는 잎(방아잎)을 추어탕 등 각종 찌개의 풍미재료로 사용하고 그 꽃은 밀원(蜜源)으로 이용하고 있다.

배초향의 성분 연구로서는 정유성분 [J. Essent. Oil Res. 8(2), 135-138, 1996; *ibid* 4(6), 585-587, 1992; 한국식품과학회지 23(5), 582-586, 1991; J. Agric. Food Chem. 40(8), 1362-1366, 1992], 세스퀴테르펜류 [Yakugaku zasshi 92(7), 908-909, 1972], 디테르펜류 [대한민국 특허 제

9608662호: Chin. Pharm. Sci. 6(3), 115-118, 1997; 생약학회지 25(4), 319-327, 1994; *ibid* 18(2), 99-102, 1987], 트리테르펜류[Yaozue Xuebao 26(12), 906-910, 1991; 생약학회지 19(2), 97-98, 1988; *ibid* 18(1), 50-53, 1987], 플라보노이드[Yaozue Xuebao 26(12), 906-910, 1991; Chem. Pharm. Bull. 29(6), 1777-1779, 1981], 페닐프로파노이드 [Yakugaku Zasshi 106(12)1108-1111, 1986], 카로티노이드류 [생약학회지 30(4), 404-408, 1999]가 보고되었다. 배초향의 생리활성에 관한 연구로서는 추출물의 항균활성 [Phytother. Res. 14(3), 210-212, 2000; J. Food Sci. Nutr. 4(2), 97-102, 1999], 항바이러스 활성 [Arch. Pharm. Res. 22(5), 520-523, 1999; US patent 5776462], 모노아민옥시데이즈 저해활성 [약학회지 42(6), 634-638, 1998]이 보고되었고, 배초향 성분 중 정유성분의 항균활성 [Zhongguo Yaozue Zazhi 35(1), 9-11, 2000; Weishengwuxue Zazhi 18(4), 1-4, 16, 1998] 및 모기기피 활성[중국특허 제1044205호], 카로티노이드 성분의 항암활성 [생약학회지 30(4), 404-408, 1999], 디테르펜류의 항암활성 [J. Nat. Prod. 58(11) 1718-1821, 1995] 및 항바이러스활성 [Arch. Pharm. Res. 22(1), 75-77, 1999], 페닐프로파노이드류의 항바이러스활성 [Arch. Pharm. Res. 22(5), 520-523, 1999], 항산화활성 [한국농화학회지 42(3), 262-266, 1999] 및 항보체활성 [생약학회지 27(1), 20-25, 1996; 한국농화학회지 39(2), 147-152, 1996]이 보고된 바 있다.

그러나, 배초향 추출물의 항염증 활성과 항동맥경화 활성에 관한 연구는 국내외적으로 보고된 바가 없어, 본 연구 결과로서 배초향의 면역조절 및 이와 관련된 항동맥경화 활성을 제시하고자 하였다.

제 2절 재료 및 방법

2-1. 배초향 추출물의 용매 분획 및 물질 분리

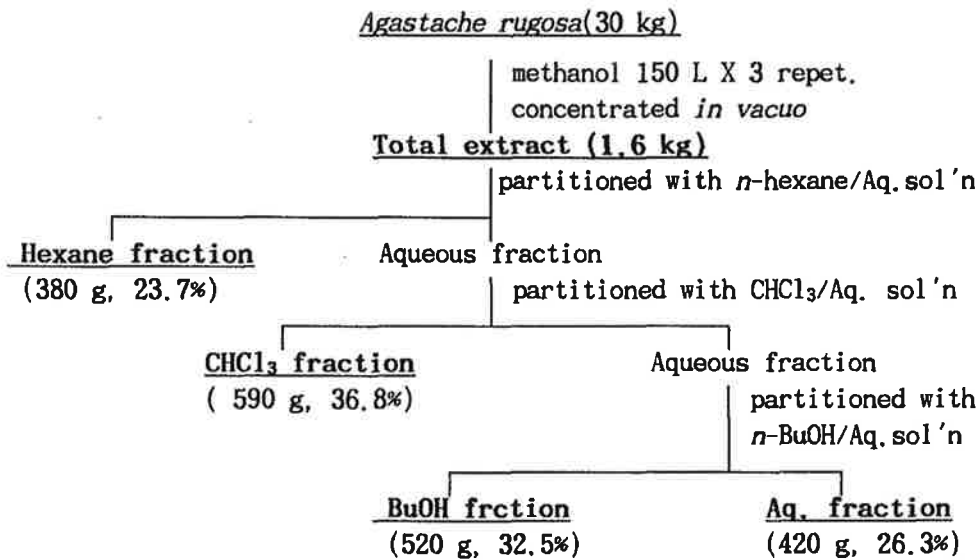
전라남도 영암의 농가 및 전남농업기술원에서 재배한 배초향의 지상부를 채취하여 음건하고 세절하여 공시시료 30 kg을 확보하였다. 본 시료에 메탄올 120 L를 가하여 3일간 정치한 후 추출, 여과하였으며, 본 과정을 3 회 반복하여 얻은 추출액을 농축하여 추출물 3.5 kg을 얻었다. 그 다음, 추출물 중 2.5 kg을 물 10 L에 현탁시킨 후 헥산(*n*-hexane) 10 L를 가하여 헥산층을 분리하였고, 이를 2 회 반복하여 얻은 헥산층을 모두 농축하여 헥산 분획물 380 g을 얻었다. 남은 수용액 층에 연이어 클로로포름(chloroform)과 부탄올(*n*-butanol)을 상기한 바와 같은 동일한 방법으로 분획한 후 농축하여 클로로포름 분획물 590 g, 부탄올 분획물 450 g, 물 분획물 980 g을 각각 얻었다. 각 분획별 성분 분리는 염증관련 *in vitro* assay (anti-complement activity, PAF antagonistic activity, cell adhesion molecule expression inhibition assay)에서 높은 활성을 나타낸 분획을 대상으로 시도하였다. 배초향 지상부(30 kg)로부터 총 추출액 (1.6 kg)을 얻은 후, 각 용매 분획과 분획별 성분을 분리한 과정은 scheme 1-4와 같다.

2-2. *In vitro* 항염증 활성 탐색

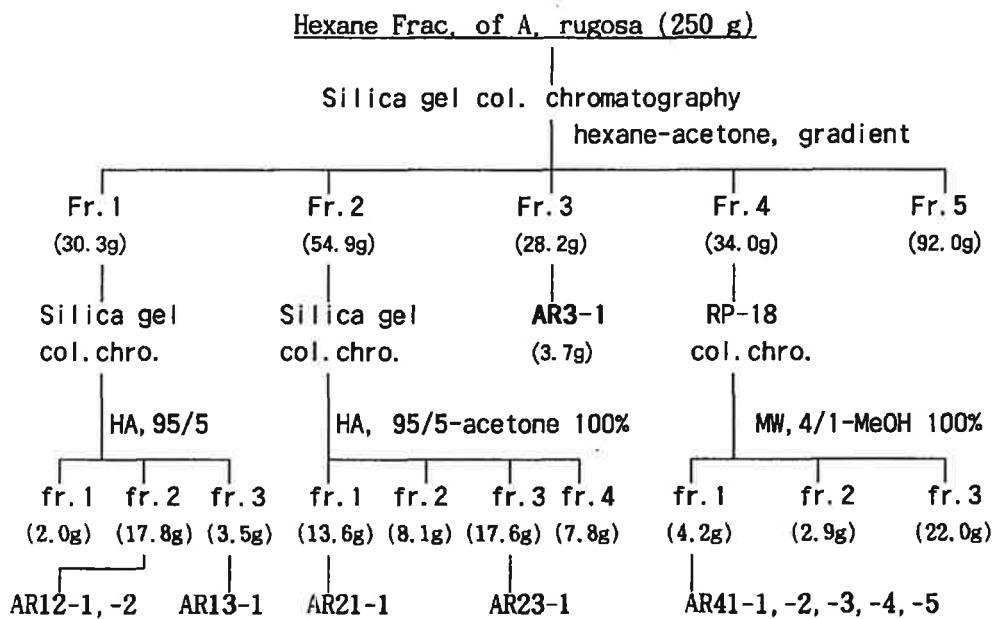
가) 항보체 활성 검정

항보체 활성측정은 Meyer 등의 방법 [Kabat, E. A. and Mayer M. M. (1961) in "Experimental Immunochimistry" 2nd ed. Charles and Thomas, USA]을 수정하여 사용하였으며 실험 과정은 다음과 같다.

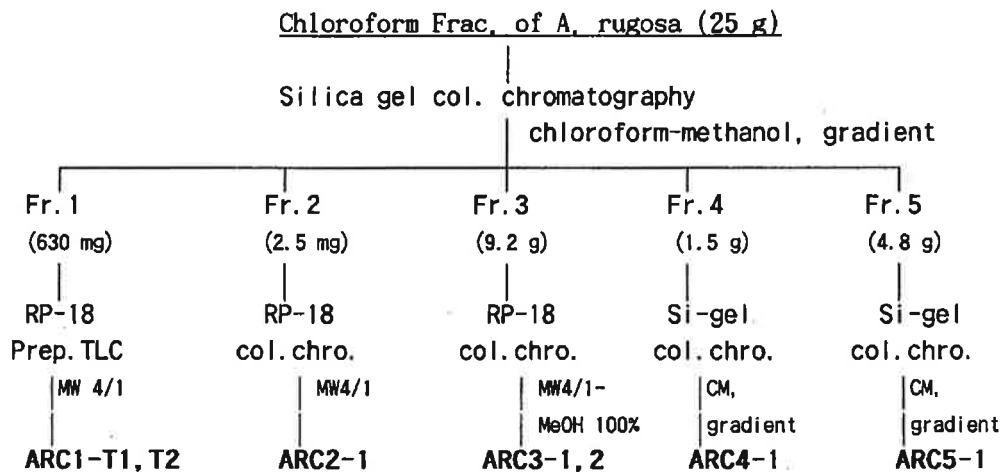
신선한 양 적혈구를 차가운 gelatin-veronal buffer (1.8 mM sodium barbital, 3.1 mM barbitric acid, 0.1% gelatin, 0.141 M NaCl, 0.3% sodium azide, 0.5 mM MgCl₂, 0.15 mM CaCl₂, pH 7.3)에서 3 회 세척한 후 5 × 10⁸ cells/ml로 농도를 맞추었다. 항체 (anti-sheep red blood cell stroma rabbit antisera, S-1389, Sigma)를 1/80 ~ 1/120으로 동일 완충용액에서 희석한 후, 양 적혈구 희석액과 동일 부피로 섞고 37 °C 항온기에서 1시간동안 느리게 교



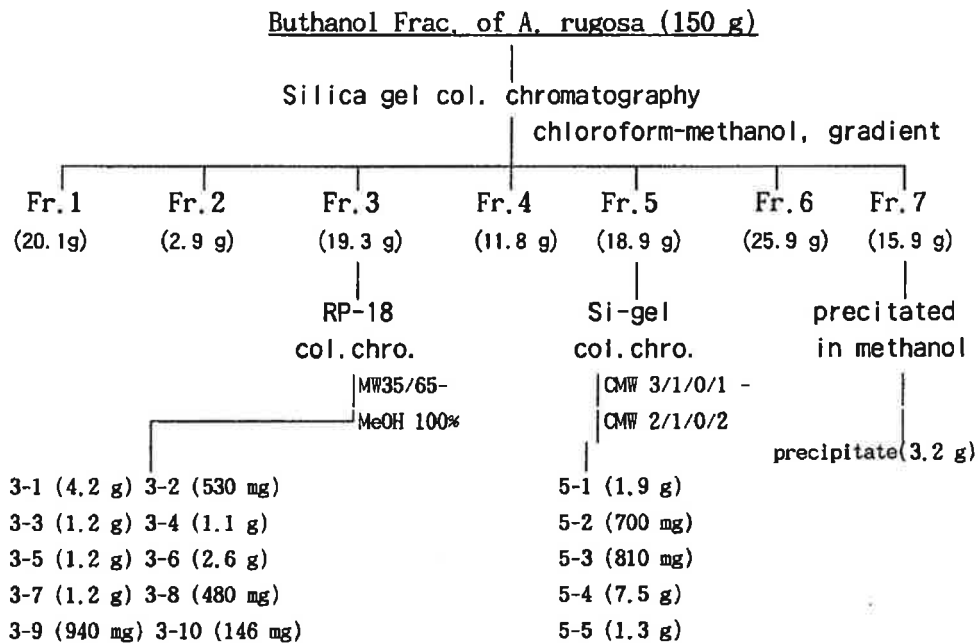
Scheme 1. Extraction and fractionation procedure of *Agastache rugosa*.



Scheme 2. Isolation procedure of compounds from Hexane Frac. of *A. rugosa*.



Scheme 3. Isolation procedure from Chloroform Frac. of *A. rugosa*.



Scheme 4. Isolation procedure from Butanol Frac. of *A. rugosa*.

반하여 면역복합체 (sensitized erythrocytes, EA)를 제조하였으며, 차가운 동일 완충용액으로 2회 세척하고 면역복합체 농도를 5×10^8 세포수/ml로 맞추었다. 인체혈액을 2500 ($\times g$)에서 원심 분리하여 얻은 혈청을 상기한 완충용액에서 1/80 ~ 1/100으로 희석 하고, 면역복합체 용액 40 μl , 보체 희석액 80 μl 및 완충용액 80 μl 를 섞은 후 37 $^{\circ}C$ 항온기에서 반응시킨 다음, 즉시 원심 분리하여 상등액 100 μl 에 대하여 504 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 각 항체 및 보체 농도별로 흡광도를 계산하여 50% 용혈 (표준 용혈)을 일으키는데 필요한 항체 및 보체의 희석 농도를 결정하였다. 그런 다음, 배초향 농축물 및 용매 분획물을 DMSO에 녹이고 표준용혈에 첨가하는 완충용액 80 μl 에 2.5%로 희석한 후 상기한 방법으로 흡광도 측정을 3 회 반복하여 시료에 의한 흡광 저하도를 계산하였다. 전체적인 실험과정은 figure 1과 같으며, 보체의 용혈활성에 대한 배초향 농축물의 용혈억제 활성을 항보체 활성도의 계산식으로 나타내면 다음과 같다.

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{\text{시료 처리군의 용혈 흡광도} - \text{시료 자체의 흡광}}{\text{반응액의 최대 용혈 흡광도} - \text{반응액 자체의 흡광}} \times 100$$

$$\text{Anticomplementary Activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 처리군의 용혈도}}{\text{표준용혈 조건의 용혈도}} \right) \times 100$$

나) ICAM-1 발현 저해활성

배초향 추출물 및 각 용매 분획물의 THP-1 세포에 대한 ICAM-1 발현 억제 활성을 조사하였으며 실험의 자세한 과정은 다음과 같다.

THP-1 세포는 RPMI-1640 배지 (RPMI-1640: GibcoBRL 23400-021, 1.62% , 0.2% Na_2CO_3 , 1% penicillin + streptomycin mixture)에 소태반 혈장 (fetal bovine serum, GibcoBRL 26140-079, 이하 FBS)을 10% 첨가한 배양액을 사용하여 CO_2 incubator (5% CO_2 , 95% relative humidity, 37 $^{\circ}C$)에서 배양하였다. 검

정용 시료는 DMSO에 녹이고 PBS에 5% 이하로 희석하고 반응액에 5%로 첨가하여, 시료를 녹인 DMSO 농도가 최종 반응액에서 0.25%를 넘지 않도록 하였다. THP1 세포 (2.5×10^5 cells/ml)를 96-well 판에 각 웰당 $200 \mu\text{l}$ 씩 분주하고, 일정 농도로 제조된 시료용액 $10 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 37°C 의 CO_2 배양기 내에서 60분 동안 배양한 후, ICAM-1의 발현을 유도하기 위해 $\text{TNF-}\alpha$ (최종농도 10 ng/ml)를 가하여 다시 CO_2 배양기 내에서 16 시간 동안 배양하였다.

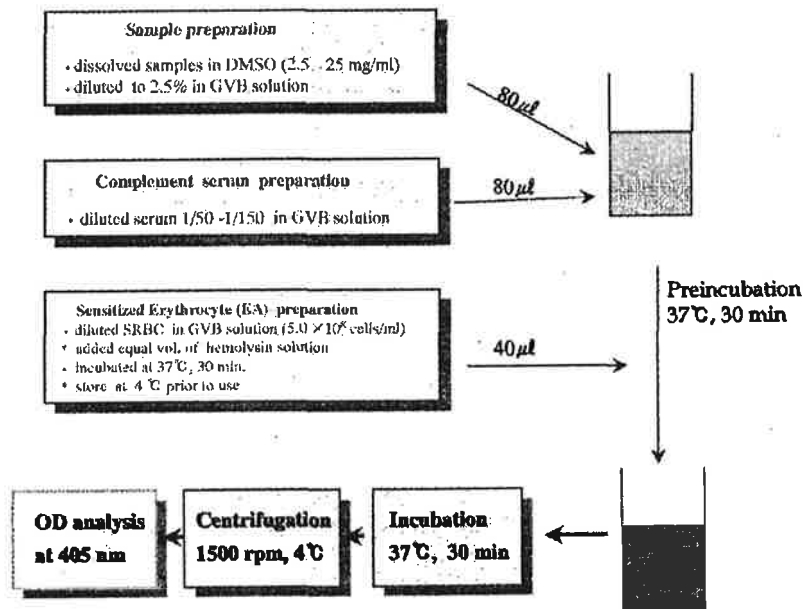


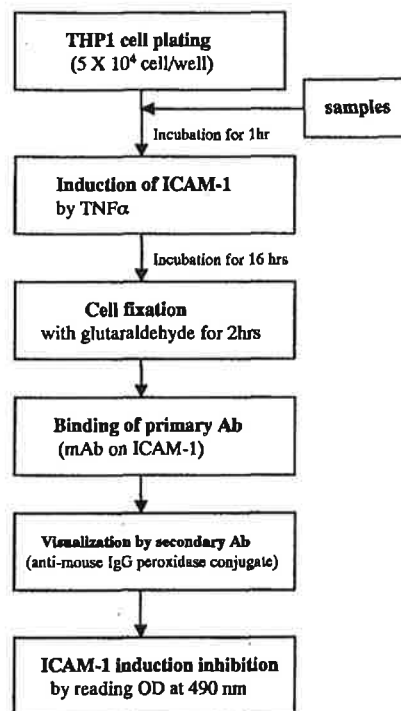
Figure 1. *In vitro* assay method for anticomplementary activity.

반응액은 글루타알데히드 완충액(glutaraldehyde 2.08% in PBS)를 $25 \mu\text{l}$ 를 가하여 세포를 판에 고정한 후, PBST (0.005% tween-20 in PBS)로 세척하고 3% 탈지유 (skim milk)를 가하여 비특이적 결합부위가 차단되도록 하였으며, 다시 세척한 후 1차 항체 (anti-human ICAM-1) 및 2차 항체 (anti-mouse IgG peroxidase conjugate)를 순차적으로 가한 다음, 발색용 기질용액 [OPD

Peroxidase substrate, (Sigma P-9187), in 0.05M phosphate-citrate buffer] 200 μ l를 가하고, 5 ~ 10분 후 3 M HCl 50 μ l를 가하여 반응을 정지시켰다. 그런 다음, spectrophotometer를 사용하여 490 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하여 TNF- α 에 의한 THP-1 세포의 ICAM-1 발현율과 시료에 의한 발현 저해율을 계산하였다. 실험의 전체적인 과정은 scheme 5와 같으며 발현 저해율 계산에 사용한 수학적식은 다음과 같다.

$$\text{ICAM-1 expression} = \frac{\text{TNF-}\alpha \text{ 처리군의 흡광도} - \text{비특이적 결합 흡광도}}{\text{무처리군의 흡광도} - \text{비특이적 결합 흡광도}}$$

$$\text{ICAM-1 발현 저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 처리군의 ICAM-1 발현 평균값}}{\text{시료 무처리군의 ICAM-1 발현 평균값}} \right) \times 100$$



Scheme 5. *In vitro* assay for ICAM-1 induction inhibition

다) VCAM-1 발현 저해 활성

배초향 추출물의 주 활성물질인 킬리아닌에 대하여 인간제정맥 내피세포 (human umbilical vein endothelial cells, 이하 HUVECs)의 VCAM-1 발현 억제 활성을 조사한 과정은 다음과 같다.

HUVECs 세포는 EGM-2 BulletKit 배지 {Kit which contains a 500ml bottle of Endothelial Cell Basal Medium-2 (EBM-2, Clonetics CC-3156, MD, USA)}에 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin을 첨가하여 사용하였으며, CO₂ 배양기내에서 배양하였다. 검정용 시료는 DMSO에 녹이고, 시료를 녹인 DMSO 농도가 최종 반응액에서 0.1%를 넘지 않도록 하였다. HUVECs 세포는 각 그룹당 10cm 세포배양접시 2장 분량 (2x10⁶ cells)를 사용하였으며, 시료를 처리하기 전에 먼저 배지를 교환해주었다. 먼저 킬리아닌을 최종농도 100 µM 및 10 µM로 2시간 동안 전처리 하였다. 그 후 TNF-α를 10ng/ml이 되게 각 그룹당 처리한 후 16 시간동안 VCAM-1의 발현을 유도하였다. 세포의 수거는 먼저 PBS로 2번 세척 후 트립신 (0.025%)을 5분간 처리하여 수거하였다. 수거한 세포는 15ml 튜브에서 원심분리 하여 상층액을 버리고, PBS로 세포침전물을 부유시킨 후 다시 원심분리하여 세척하였다. 세포 PBS로 2회 세척 후 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin)를 첨가한 PBS 100µl에 부유시킨 다음 마우스 항인 단일항체 (mouse anti-human monoclonal antibody) (Rb 1/9; 1µg/ml)를 첨가했다. 얼음 위에서 30분 동안 단일항체가 결합하도록 유도한 후 세포를 차가운 PBS로 세 번 씻어내고, PBS에 1:25로 희석한 염소 F(ab')₂ 항마우스 IgG와 접합된 FITC로 얼음에서 40분간 반응시켰다. 이들 세포를 1% paraformaldehyde로 고정하고 유세포 분석기 (FACScan, Bio-Rad, USA)을 이용하여 킬리아닌에 의한 VCAM-1 발현 억제 활성을 측정하였으며 억제 활성도 계산식은 다음과 같다.

$$\text{VCAM-1 발현 저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 처리군의 형광강도 평균값}}{\text{시료 무처리군의 형광강도 평균값}} \right) \times 100$$

라) PAF 길항활성

혈소판 현탁액 조제: ACD 용액 (trisodium citrate 2.5%, citric acid 1.37%, glucose 2%) 1용량을 주사기에 미리 넣고 뉴질랜드산 토끼의 심장에서 혈액을 5용량 취한 후 즉시 원심분리 (280 ×g, 10 min)하여 적혈구를 제거한 platelet rich plasma (PRP)를 얻었다. PRP를 다시 원심분리 (1200 ×g, 10 min)하여 얻은 혈소판 pellet을 Tris-완충액① (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 0.1 % glucose, pH 7.5)로 세척하고 적량의 Tris-완충액② (10 mM Tris, 25 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 2 mM EGTA, 0.1 % glucose, 0.25 % BSA, pH 7.0)를 가하여 2×10⁸ cell/ml이 되도록 희석하였다.

PAF 용액 조제: ³H-PAF 일정량을 취하여 질소기류로 용매를 제거한 후, Tris-완충액①을 가하여 5 nM로 희석하고 3분간 sonication하였다. 이를 total binding용과 nonspecific binding용 용액으로 이등분하여, total binding용은 Tris-완충액②로 2배 희석 (³H-PAF 2.5 nM)하였으며, nonspecific binding용은 비방사성 PAF (C₁₈: P6537, Sigma)를 가하여 희석 (³H-PAF 2.5 nM, cold-PAF 1.3 μM)하여 각 PAF용액을 조제하였다.

PAF 수용체 저해활성 측정: 일정 농도의 시료액 (3 % DMSO Tris-완충액①) 25 μl에 혈소판 현탁액 100 μl를 가하여 37 °C에서 10분간 정치한 후 PAF 용액을 90 μl (최종농도 ³H-PAF 1 nM, 7×10⁴ dpm, cold-PAF 0.46 μM)를 가하여 37 °C에서 30분간 배양하였다. 배양액을 multiscreen assay system을 이용하여 Tris-완충액①로 미리 적신 membrane filter에서 감압여과하여 반응을 중단하고, 상온에서 건조한 후 membrane filter를 각 vial에 넣고 방사능 측정용액을 3 ml씩 가하여 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하였다. 각 실험구의 표준 PAF 결합량은 시료없이 3 % DMSO Tris-완충액①만 가하여 동일한 방법으로 수행하였으며, 방사능 측정값은 3검체의 평균치로 표시하였다.

PAF 수용체에 결합된 specific binding과 검정시료에 의한 PAF 수용체 결합 저해율을 조사한 전체적 실험과정은 figure 2와 같으며 계산식은 다음과 같다.

Specific Binding = Total Binding - Nonspecific Binding

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{Sc - Ss}{Sc} \times 100 = \frac{(Tc - Nc) - (Ts - Ns)}{Tc - Nc} \times 100$$

Sc = Specific binding of control, Ss = Specific binding of sample
 Tc = Total binding of control, Ts = Total binding of sample
 Nc = Nonspecific binding of control, Ns = Nonspecific binding of sample

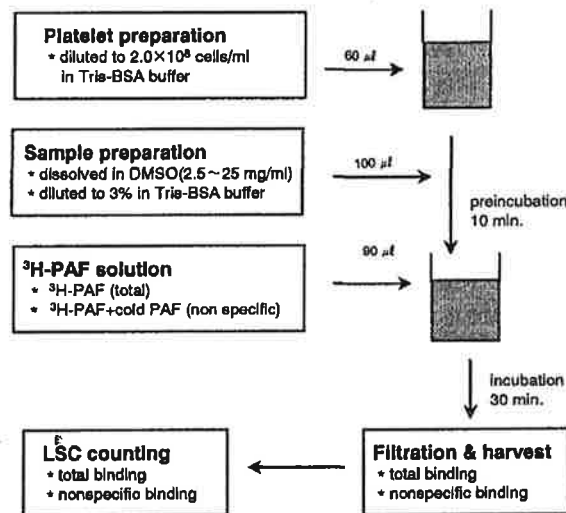


Figure 2. *In vitro* assay for PAF binding inhibition

마) NO 생성 억제 활성

배초향 추출물 및 각 용매 분획물에 대하여 지방다당질 (lipopolysaccharide, 이하 LPS)로 활성화를 유도한 쥐 단핵구/대식세포 세포주 RAW264.7 (이하 RAW264.7 세포)에서 시료에 의한 NO 생성 억제 활성을 조사한 실험 과정은 다음과 같다.

본 연구의 방법은 Sherman 등의 방법 [Sherman et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 1301-1308, 1993]을 수정하여 사용하였으며, RAW264.7 세포를 대상으로 NO의 안정한 산화 생성물인 질산이온 (NO_3^-)의 생성을 측정하고 시료에 의한 생성 억제율을 측정하였다. Dulbecco's Modified Eagle's medium (Gibco BRL, USA, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 10% FBS, 6 g/L HEPES, 3.7 g/L NaHCO_3)에서 배양한 RAW264.7 세포 (5×10^5 cells/ml)에 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 활성화를 유도하고, CO_2 incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 배지를 원심분리 (1000 rpm, 10 분)하여 얻은 상등액 100 μl 에 그리스 시약 [Griess reagent: 37.5 mM sulphanic acid), 12.5 mM N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride), 6.5 mM HCl] 100 μl 를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 spectrophotometer를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 0 ~ 50 μM 의 농도별로 제조한 질산염을 사용하여 NO_3^- 농도-흡광도 상관 계수를 작성한 후 RAW264.7 세포에서 생성된 NO_3^- 농도를 계산하였다. 상기 실시예 1에서 제조한 시료의 NO 생성 억제 활성 측정 은 시료를 DMSO에 녹인 후, RAW264.7 세포에 LPS를 처리하기 2시간 전에 0.1%로 첨가하여 반응 후 NO_3^- 농도를 측정하여 시료에 의한 NO_3^- 생성 억제율을 계산하였다.

$$\text{질산 농도 표준식} = \text{흡광도}(540 \text{ nm}) \times 179.4215 - 8.5221$$

$$\text{NO 생성 억제율}(\%) = \frac{\text{시료 처리군의 질산 농도 평균값}}{\text{지질 처리군의 질산 농도 평균값}} \times 100$$

2-3. *In vivo* 항염 활성

실험동물은 스프래그-돌리 수컷 쥐(male Sprague-Dawley rats, 210 ~ 220 g)를 사용하였고 기염제로서는 carrageenan을 사용하였으며, 실험동물에 부종을 유도한 후 상기 실시예 1에서 얻은 배초향 추출물에 의한 부종 억제율을 조사하였다. 실험의 자세한 과정은 다음과 같다.

배초향 추출물을 물에 현탁한 후 마리당 200 mg/kg을 경구투여한 후 1시간 뒤에 카라기난 현탁액(1% carrageenan suspension in 0.85% 식염수) 0.1 ml를 실험동물 후지족척에 피하투여하였다. 실험동물은 7마리를 1군으로 하여 투여 직후부터 5시간까지 매시간마다 발바닥 두께를 측정하였으며, 이때 시료 대신에 생리식염수를 투여한 무처리군의 발바닥 두께를 함께 측정하여 시간별 무처리군의 부종 증가에 대한 시료 처리군의 부종 억제율을 조사하였다.

$$\text{부종 억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 처리군의 발바닥 부피 증가량 평균값}}{\text{시료 무처리군의 발바닥 부피 증가량 평균값}} \right) \times 100$$

2-4. *In vivo* 항동맥경화 활성

사용한 실험동물은 저밀도 지단백질 수용체 결핍 마우스 6 ~ 8주령(평균체중 16.8 g) 암컷을 임의로 10마리씩 2그룹으로 나누었다. 한 그룹은 한 고지방 펠릿 사료(15% 지방, 1.25% cholesterol 및 0.5% sodiumcholate 함유)를 섭취시켰고, 다른 한 그룹은 상기사료에 배초향 추출물이 0.1% 및 1%되게 섞은 펠릿 사료를 섭취시켰다. 실험기간 중에는 고형사료와 물을 자유롭게 공급하였다.

실험 개시 8주 후에 모든 마우스에서 안구를 통한 채혈을 실시하였다. 이후 이 마우스의 심장과 동맥을 PBS로 10분간 관류를 하였고 다시 5분간 paraformaldehyde로 관류하였다. 이러한 과정이 끝난 심장과 동맥을 떼어내고

10% 중성 포르말린에 24시간 담근 후 OCT medium (10.24% polyvinyl alcohol, 4.26% polyethylene glycol, 80.5% nonreactive ingredient, w/w, Life Science International, England, UK)으로 포매하였고 -70 ℃에서 냉동보관하였다. 냉동된 조직 절편을 -20 ℃가 유지되는 절편기를 이용하여 심장판막이 보이는 동맥부분을 기시점으로 하여 심장부분으로 9 μm씩 6장의 절편을 제조한 후, 염색약 오일 레드 O(Oil red O)로 염색하고 Harris hematoxylin 으로 counter staining을 수행하였다. 염색된 절편을 이미지 분석기를 사용하여 각 동물 그룹의 평균 병변의 면적을 측정하여, 무처리군의 병변 발생에 대한 배초향 추출물 처리군의 병변 억제 활성을 계산하였다.

$$\text{동맥경화성 병변 억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{추출물 섭취군의 평균 병변크기}}{\text{고지질식 섭취군의 평균 병변크기}}\right) \times 100$$

제 3절 결과 및 고찰

본 연구의 목적은 추출물을 제품화할 때 추출물 성분들의 면역조절 활성을 비롯한 생리활성을 규명하여 가공식품의 부가가치를 높이는 것이다. 이와 관련하여 면역조절 활성연구는 1차년도와 2차년도에서 서로 다른 항염증 pathway에서 활성을 나타낸 성분들을 분리하고 구조-활성관계를 규명하여 배초향 추출물의 면역조절 활성의 근거를 확보하는데 목적을 두고 수행하였으며, 3차년도에는 *in vivo* 모델에서 항염 활성 및 이에 근거한 항동맥경화 활성을 규명하고자 하였다.

3-1. 항보체 활성물질

배초향 추출물 및 용매분획에 대한 항보체 활성검정 결과, 배초향 추출물은 매우 높은 항보체 활성을 나타내었음을 알 수 있었으며, 활성은 주로 핵산분획

과 클로로포름분획에서 유래한 것임을 확인할 수 있었다.(Table 1)

Table 1. Anticomplementary activity of the extracts of *Agastache rugosa*.

Sample	% Inhibition at				
	250 ($\mu\text{g/ml}$)	125 ($\mu\text{g/ml}$)	62.5($\mu\text{g/ml}$)	32($\mu\text{g/ml}$)	16($\mu\text{g/ml}$)
Total extract	95.3 \pm 0.7	95.6 \pm 1.1	63.8 \pm 2.0	62.7 \pm 5.4	-
Hexane frac.	-	100.7 \pm 0.2	99.7 \pm 0.1	98.5 \pm 0.3	-4.1 \pm 1.7
CHCl ₃ frac.	-	100.4 \pm 1.2	100.2 \pm 0.1	60.2 \pm 0.9	12.6 \pm 2.7
BuOH frac.	-	49.8 \pm 1.1	26.3 \pm 2.7	1.3 \pm 1.8	-1.5 \pm 2.0
Aqueous frac.	21.7 \pm 4.9	8.1 \pm 3.3	-	-	-

배초향의 향보체 활성물질로서 핵산 분획으로부터 C-18 불포화지방산류, phytosterols를 분리하였으며, 클로로포름 분획에서는 oleanolic acid, ursolic acid, rosmarinic acid methyl ester, 부탄올 분획에서는 rosmarinic acid 등을 분리하였다. 이들 화합물들은 모두 기존에 보고된 바 있는 물질이었으므로 구조 동정을 수행한 spectral data는 부록으로 수록하였으며, 그 결과를 요약하면 Table 2과 같다.

Table 2. Active constituents from *A. rugosa* extracts against complement system and ICAM-1 adhesion.

Compound group	Identified as	Analysis Method	Remarks
Essential oil	limonene (7.1%), menthone (11.5%) isomenthone (51.6%) pulegone (25.1%) β -caryophyllene (3.1%) γ -cardinene (0.6%), germacrene B (0.3%)	GC-MS ^{1a)}	Fragrance (no activity)
	limonene (1.9%), menthone (1.2%) isomenthone 1.2%) methylchavicol (94.0%) β -caryophyllene (1.2%)	"	
Fatty acid	stearic acid (ARH12-1)	GC-MS ^{1b)}	weak anticomplement activity
	oleic acid (ARH 12-2)	"	anticomplement activity
	linoleic acid (ARH 12-2)	"	anticomplement activity ICAM-I adhesion inhibition
	linolenic acid (ARH13-1)	"	anticomplement activity ICAM-I adhesion inhibition
Terpenoid	phytosterols (ARH3-1) (campesterol 4.1%, stigmasterol: 5.8%, β -sitosterol : 90.1%)	"	anticomplement activity
	daucosterol (ARC1-2)	NMR ²⁾	weak anticomplement activity
	ursolic acid (ARC3-1a)	"	complement activation activity
	oleanolic acid (ARC3-1b)	"	anticomplementary activity
Flavonoid	acacetin (ARC2-1)	"	ICAM-I adhesion inhibition
	diosmetin (luteolin-4'-methyl ether) (ARC1-T1)	"	ICAM-I adhesion inhibition
	tilianin (acacetin-7-O-Glc) (ARM ppt, ARC5-1)	"	ICAM-I adhesion inhibition
	kaempferol-3,4,7-trimethyl ether (ARC1-T2)	"	ICAM-I adhesion inhibition
Phenolic compound	rosmarinic acid (ARB5-1)	"	anticomplement activity
	rosmarinic acid methyl ester (ARC4-1)	"	anticomplement activity

¹⁾ GC : Hewlett Packard 6890; column, DB-5MS (30 m, id 0.25 mm); carrier gas He (99.9999%);

MS : JEOL SX102A (double sector type, Akijima, Japan) ionization mode : Electron Impact (EI),
electron energy: 70 eV source temp.: 200°C

condition : injection temp., 270 °C; oven temp.: 80°C//15°C/min//280°C (5 min)

²⁾ NMR : Varian Unity 300, ¹H-NMR (300 MHz), ¹³C-NMR (75 MHz), DEPT, HMQC, COLOC (or HMBC:
500 MHz)

배초향의 항보체 활성물질들은 구조의 상이함에도 불구하고 공통적으로 구조 중 극성 작용기 (carboxyl group and/or hydroxyl group)를 가지고 있다는 결과로서 항보체 활성에는 극성 작용기의 존재가 필수적으로 판단되었다. 한편, flavonoids 성분들이 항보체 활성을 나타내지 않았던 점으로 보아 극성 작용기 외에 활성 발현에 필요한 구조적 특이성이 있음을 시사하고 있다. 분리한 활성 물질별로 항보체 활성을 조사한 결과는 table 3과 같다.

Table 3. Anticomplementary activity of the constituents from the extracts of *Agastache rugosa*.

Sample	% Inhibition				
	250 ($\mu\text{g/ml}$)	125 ($\mu\text{g/ml}$)	62.5 ($\mu\text{g/ml}$)	32 ($\mu\text{g/ml}$)	16 ($\mu\text{g/ml}$)
Total extract	95.3 \pm 0.7	95.6 \pm 1.1	63.8 \pm 2.0	62.7 \pm 5.4	-
Hexane frac.	-	100.7 \pm 0.2	99.7 \pm 0.1	98.5 \pm 0.3	-4.1 \pm 1.7
palmitic acid			IC ₅₀ : 200 μM		
stearic acid			IC ₅₀ : 468 μM		
oleic acid			IC ₅₀ : 22.3 μM		
linoleic acid			IC ₅₀ : 47.5 μM		
linolenic acid			IC ₅₀ : 37.8 μM		
CHCl ₃ frac.	-	100.4 \pm 1.2	100.2 \pm 0.1	60.2 \pm 0.9	12.6 \pm 2.7
oleanolic acid			IC ₅₀ : 69.0 μM		
phytosterols			IC ₅₀ : 8.10 $\mu\text{g/ml}$		
rosmarinic acid			IC ₅₀ : 260 μM		
methylester					
BuOH frac.	-	49.8 \pm 1.1	26.3 \pm 2.7	1.3 \pm 1.8	-1.5 \pm 2.0
rosmarinic acid			IC ₅₀ : 105 μM		
Aqueous frac.	21.7 \pm 4.9	8.1 \pm 3.3	-	-	-

가) 지방산의 항보체 활성화

활성 성분중 지방산의 항보체 활성화는 포화 지방산의 경우 활성이 미약하였으나 불포화 지방산은 매우 높은 활성을 나타낸 결과로 보아 구조내 불포화도의 존재로 인한 입체구조 (*cis*-form)가 활성화에 중요한 역할을 한 것으로 추정하였다. 식물의 지방산 성분에 대한 항염 활성화는 이미 많은 연구가 되어 있는데 n-3 fatty acid 및 이를 함유하는 지방추출물이 atopic exzema, rheumatoid arthritis에 효과가 있으며, 5-lipoxygenase의 inhibitor로서 보고 (A review of terrestrial plants and marine organisms having antiinflammatory activity, Int. J. Pharmacogn. vol 33, 81-97, 1995)된 바 있다. 그러나 지방산에 대한 항보체 활성화에 대한 연구 및 지방산 구조에 따라 항보체 활성화가 다르게 나타나는 결과는 본 연구에서 처음으로 규명한 것으로서 지방산의 항염활성을 설명하는 근거의 하나로 제시할 수 있을 것으로 판단된다.

Fatty acid	IC ₅₀
palmitic acid (hexadecanoic acid)	200 µM
stearic acid (octadecanoic acid)	468 µM
oleic acid (9-octadecenoic acid)	22.3 µM
linoleic acid (9,12-octadecadienoic acid)	47.5 µM
linolenic acid (9,12,15-octadecatrienoic acid)	37.8 µM

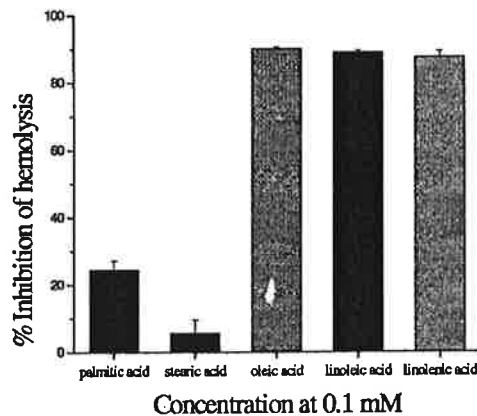


Figure 3. Anticomplementary activity of fatty acids from *Agastache rugosa* on classical pathway of complement system

나) Terpenoid의 항보체 활성

Phytosterols (campesterol, stigmasterol and β -sitosterol)의 경우 본 탐색계에서 분리된 성분 중 가장 활성이 높은 성분으로서 혼합물 및 각 성분에 대한 항보체 활성은 이미 보고된 바 (Chem. Pharm. Bull. vol. 35, 4851-4855, 1987) 있다. 이 성분은 배초향 추출물의 주요 성분 중 하나로서 지방산과 함께 배초향의 높은 항보체 활성의 주성분으로 작용하는 것으로 판단된다. 그러나 daucosterol (β -sitosterol-3-O-Glc)의 경우 활성이 낮게 나타난 점은 23종 steroid의 항보체 활성에 대한 보고 (Yakugaku Zasshi vol 111, 299-305, 1991)로 볼 때, 구조 중 3-OH가 free form일 때 항보체 활성에 중요한 역할을 하는 것을 시사하고 있다.

triterpenoid 중 ursolic acid와 oleanolic acid는 대표적인 항염, 간세포 보호 활성 물질로 *in vitro* 및 *in vivo* 활성이 보고된 화합물인데, 항보체 활성 검정에서는 매우 특징적인 결과를 나타내었다. 즉, ursolic acid는 적혈구에 대한 직접적인 용혈작용은 없었으나 보체 함유 serum의 존재하에서 보체의 용혈활성을 증가시키는 작용을 하였다. 한편, oleanolic acid는 높은 항보체 활성을 나타내었는데, 구조중 28-COOH를 methylation하면 항보체 활성이 나타나지 않았다. 본 연구 결과는 triterpenoid 구조 중 극성 작용기 (carboxylic acid, hydroxyl group)가 free form으로 존재하여야 활성을 발현한다는 점을 시사하고 있으며, 이러한 결과는 triterpenoid 중 β -boswellic acid를 비롯한 triterpenoic acid와 β -amyrin 등 neutral triterpenoids의 활성비교 연구에서 구조내 carboxylic acid의 존재가 항보체 활성발현과 관계가 있다는 보고 (Phytomedicine vol. 3, 77-81, 1996)와 일치하고 있다.

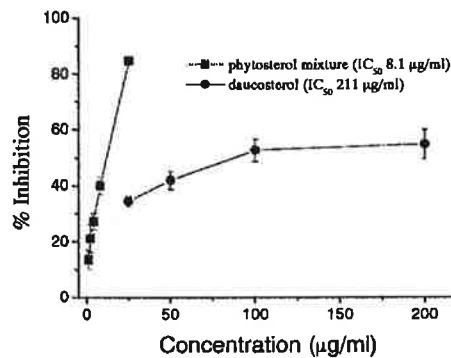
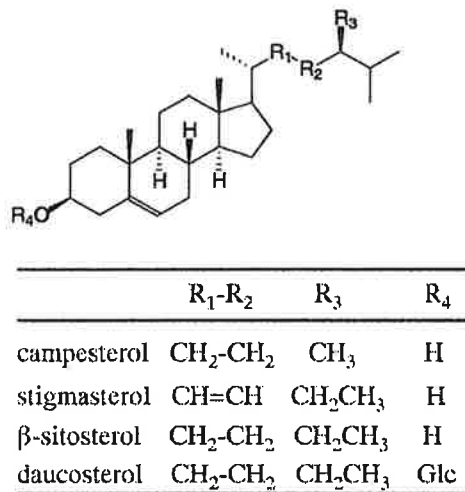


Figure 4. Anticomplementary activities of phytosterols (campesterol 4.1%, stigmasterol 5.8%, β-sitosterol 90.1%) and daucosterol on the classical pathway of complement system.

다) phenolic compounds의 항보체 활성

배초향 추출물의 극성 성분 중 항보체 활성을 나타낸 성분은 phenylpropanoid 성분으로서 rosmarinic acid (RA)와 rosmarinic acid-methylester (RAM)화합물을 분리하였다. 천연물 분리시 methanol 추출 및 분리과정에서 carboxyl group은 methylation되기 쉬운데, 본 연구에서 분리한 RAM 역시 분리과정 중 RA에서 유래한 artifact로 판단하였다. 한편, 이들의 활성결과로부터 RA 구조중 carboxyl group이 활성에 매우 중요한 작용을 하였음을 추정할 수 있었으며, RAM의 phenolic OH를 methylation하여 활성을 조사한 결과 methylation이 많이 될수록 활성이 낮아짐을 확인할 수 있었다. rosmarinic acid는 항보체 활성, arachidonic acid 대사과정중 LTB₄ 및 5-HETE 활성 저해작용, 지질과산화 저해작용 등 항염 및 항산화 활성이 보고된 화합물로서 본 연구진이 배초향 지하부로부터 분리하여 활성을 보고 한 바 있다. (Kor. J. Pharmacogn. vol. 27, 20-25,1996) rosmarinic acid의 염증조절 활성

은 매우 높은 항산화 활성과 더불어 기능성 식품 개발에서 매우 유용한 활성물
질로서 역할을 할 것으로 기대하고 있다.

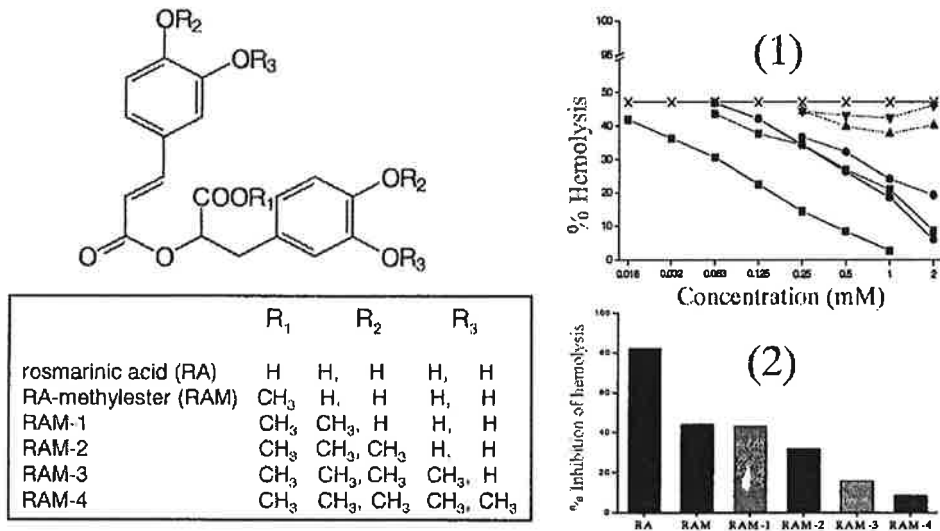


Figure 5. Anticomplementary effects of rosmarinic acid and its
metylated derivatives on classical pathway of complement
system.

1: standard hemolysis -x-; RA ■; RAM ●; RAM ■; RAM-2 ●; RAM-3 ▲; RAM-4 ▼.
2: % inhibition at 0.5 mM

3-2. 세포부착물질 발현 저해 활성물질

혈관내 순환하는 염증세포와 감염부위의 혈관내피세포가 염증매개물질 (cytokines, complements)에 의해 자극을 받으면 세포부착물질이 발현되어 감염부위로 염증세포들이 유입되고 집적되면서 전반적인 염증반응이 활성화된다. 따라서 염증관련 세포의 세포부착물질의 발현을 억제하는 것은 염증반응의 초기단계에서 염증세포의 유입과 활성화를 억제할 수 있어 과도한 염증반응을 조절할 수 있다.

본 연구에서는 THP1 cell을 cytokine (TNF- α)을 처리하여 ICAM-1의 발현

을 유도한 후 배초향 추출물 및 각 용매별 분획의 ICAM-1 발현 저해활성을 검정한 결과는 table 4와 같다.

Table 4. Inhibition activity of ICAM-1 expression by the extract of *Agastach rugosa*

Sample	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	% Inhibition of ICAM-1 expression
Total extract	25	12.3 \pm 2.7
	50	18.4 \pm 3.2
Hexane frac.	25	17.4 \pm 2.3
	50	41.4 \pm 4.2
CHCl ₃ frac.	25	12.0 \pm 12.6
	50	37.1 \pm 1.5
BuOH frac.	25	13.9 \pm 3.3
	50	21.4 \pm 4.6
Dexamethasone*	30 μM	40.1 \pm 1.7

* positive control

배초향 추출물의 ICAM-1 발현 저해활성은 헥산 분획과 클로로포름 분획에서 positive control인 dexamethasone과 유사하게 높은 활성을 나타내었다. 헥산 분획의 활성물질을 조사한 결과 불포화 지방산류임을 확인하였다. 불포화 지방산류의 경우, 많은 식물체에 존재하는 성분으로 신규 성분이 아니며, 분리과정 중에 산화가 쉽게 일어나고 각 성분들의 chromatographic behavior가 유사하여 각각을 단리하는 것이 큰 의미가 없으므로 GC-MS spectrum으로 각 성분들을 동정한 후에 표준품을 사용하여 성분별 ICAM-1 발현 저해 활성을 조사하였다. (Figure 6) 그리고, 클로로포름 분획에서는 다양한 flavonoids 화합물들이 ICAM-1 발현 저해 활성을 나타내었다. 이들 화합물들의 그 중 diosmethin 화합물이 활성이 가장 높게 나타났으나 주요 활성성분으로 평가하기에는 함유량이 매우 적었다. 한편, tilianin은 경우, 배초향에 가장 함유량이 높고, 다양한 검색 과정에서 공통적으로 활성을 나타낸 성분으로서 *in vivo* 활성에 적용할

만한 대상으로 평가할 수 있다.(Figure 7) Flavonoids 화합물들은 항보체 활성화에서는 활성이 나타나지 않았다는 점으로서 항염증 활성화에서 그 작용 mechanism이 항보체 활성물질과 다르다는 점을 시사하고 있다.

3-3. PAF 길항 활성

혈소판 활성화인자에 대한 길항활성을 조사한 결과는 Table 5과 같다. 총 추출액의 활성은 낮은 수준이었고 hexan분획의 활성은 positive control과 유사한 활성을 나타내었다. 그러나 전반적으로 낮은 활성을 나타내었기에 본 경로를 통한 항염 활성의 의미는 미약할 것으로 판단하였다.

Table 5. PAF antagonistic activity of ICAM-1 expression by the extracts of *Agastach rugosa*.

Sample	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	% Inhibition
Total extract	200	24.3
Hexane frac.	200	37.4
CHCl_3 frac.	200	17.3
BuOH frac.	200	5.3
Magnolina Flos*	40 μM	55.8

* positive control

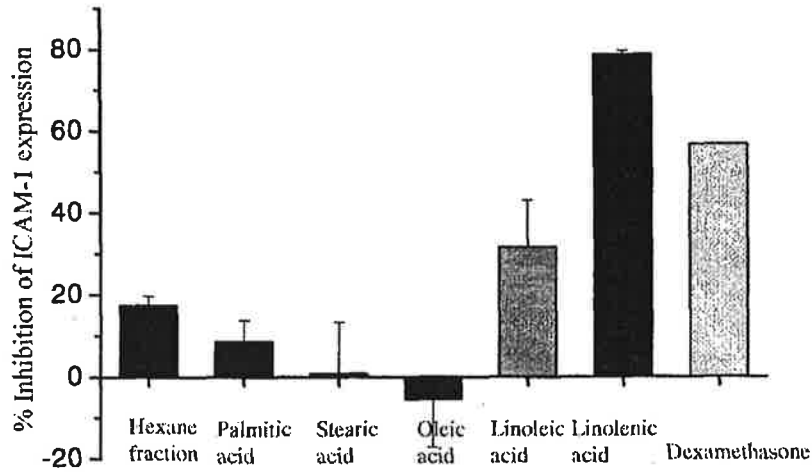


Figure 6. Inhibition activity of ICAM-1 expression of the fatty acids isolated from the extract of *Agastache rugosa*.

Each sample was treated at 25mg/ml, Dexamethasone was a positive control(30 mM)

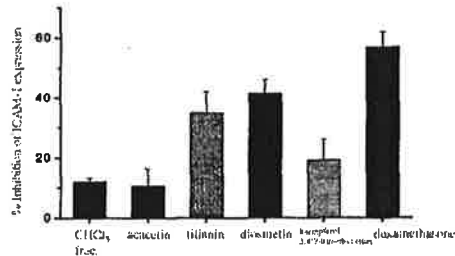
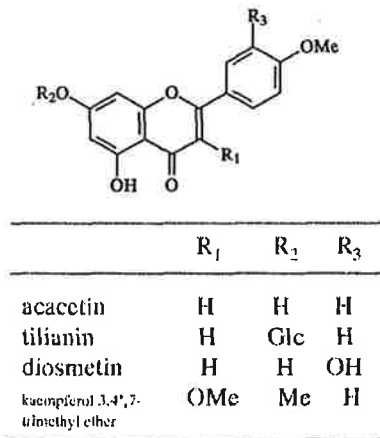


Figure 7. Inhibition activity of ICAM-1 expression of the flavonoids isolated from the extract of *Agastache rugosa*.

Each sample was treated at 25mg/ml, Dexamethasone was a positive control (30 mM)

3-4. NO 생성 저해 활성

배초향 추출물과 각 용매분획에 대한 NO 생성 저해 활성을 조사한 결과는 Table 6과 같다. 활성은 클로로포름 분획에서 강한 NO 생성 저해 활성이 나타남을 확인하였다.

배초향의 분리된 주요 성분들에 대하여 NO 생성 저해 활성을 조사한 결과, 헥산 분획에 함유된 불포화 지방산류는 활성이 매우 낮았으며, 클로로포름 분획에서 분리한 acacetin, tilianin 등 flavonoid류가 높은 활성을 나타내었고, phytosterols 및 triterpenoid류는 미약한 활성을 나타내었다. 주 성분인 Tilianin의 경우, NO 억제활성은 iNOS mRNA 발현의 억제작용에 기인하였음을 확인하였으며 (Figure 8), 또한, 염증 매개 인자 interleukin-6 (IL-6)에 대하여 mRNA 발현 및 IL-6의 발현량을 현저하게 억제하였고 (Figure 9), VCAM-1의 발현 역시 현저하게 억제하였음을 확인하였다 (Figure 10). 한편, 이들 유전자의 발현 억제 활성은 Tilianin이 10^{-5} M - 10^{-4} M에서 NF- κ B 유전자 발현이 감소되었음을 확인함으로써, tilianin에 의한 NO의 생성저해작용, iNOS 및 IL-6 유전자 발현 저해 활성은 NF- κ B 경로를 통한 활성임을 추정할 수 있었다.

Table 6. Inhibition activity of NO synthesis of the extract and fractions from *Agastache rugosa* *in vitro*.

Sample	dosage (μ g/ml)	amount of NO (nM)	Inhibition of NO (%)
control	-	4.35 \pm 1.6	-
LPS	-	26.9 \pm 4.2	-
LPS +extract	50	17.1 \pm 3.4	43.6*
	100	13.7 \pm 2.1	58.7*
LPS + hexane	50	24.7 \pm 7.9	9.8
frac.	100	13.7 \pm 4.3	58.7*
LPS + CHCl ₃ frac.	50	14.0 \pm 1.1	57.3**
	100	8.9 \pm 3.4	80.0**
LPS + BuOH frac.	50	24.2 \pm 4.2	12.0
	100	13.6 \pm 0.2	59.1**

** P < 0.01, * P < 0.05

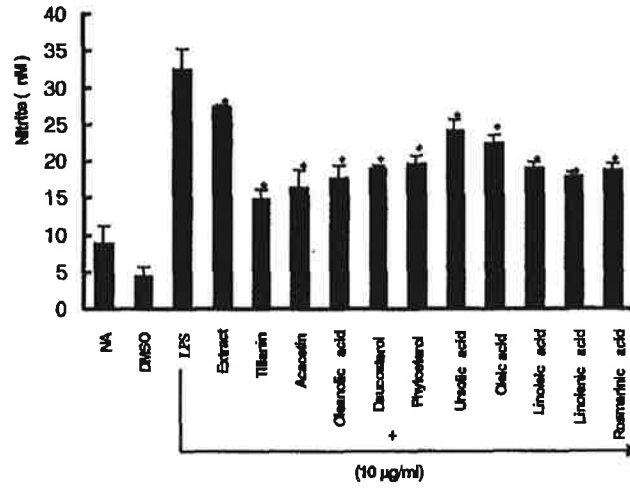


Figure 8. Inhibition of NO production by the extract and isolated compounds from *A. rugosa* in LPS-activated RAW 264.7 cells. Mouse macrophage cell line, RAW 264.7 cells (5×10^5 cells/ml) were treated with extract ($30 \mu\text{g/ml}$) and the purified compounds ($10 \mu\text{M}$) in the presence of LPS ($10 \mu\text{g/ml}$). Nitrite in the media was measured by the Griess reagent. Data bars represent the mean \pm SD ($n=3$).
* $P < 0.01$, significantly different from the LPS-activated group.

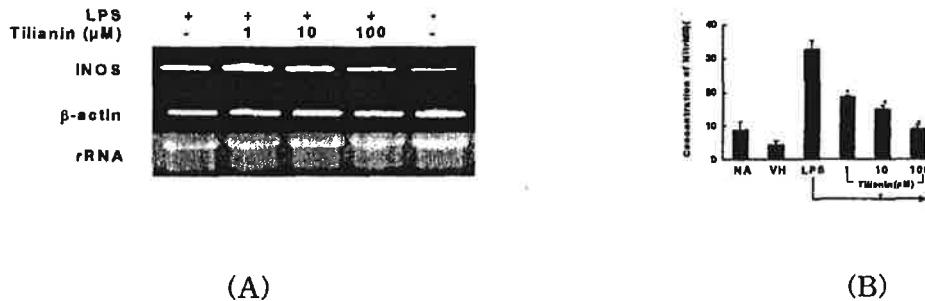


Figure 9. Inhibition activity of nitrite production by tilianin in RAW 264.7 macrophages.
A: RT-PCR for iNOS ; B: ELISA ($n=3$, * $P < 0.01$)

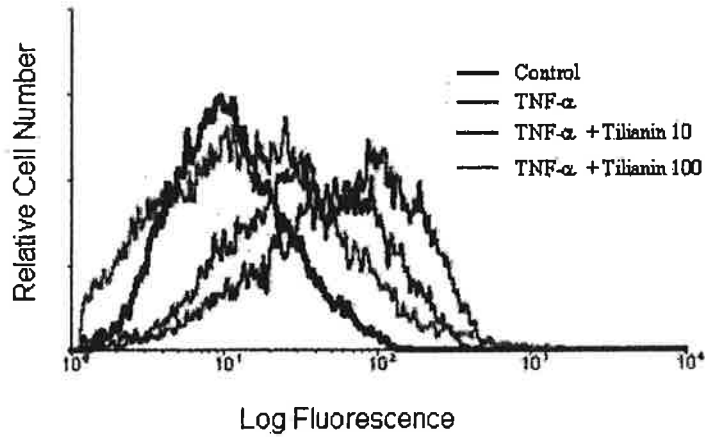


Figure 10. Dose-dependent effect of tilianin on endothelial adhesion molecule induction. HUVECs were pre-incubated with 10 or 100 μ M for 2 h and stimulated with TNF- α (10 ng/ml, 16 h), stained for VCAM-1 or isotype control, and analyzed by flow cytometry.

3-5. 배초향 추출물의 *in vivo* 항염 활성

상기한 바와 같이, 배초향 추출물 및 성분을 대상으로 한 *in vitro* 항염 활성 탐색 결과, 다양한 배초향 성분 화합물로부터 다양한 경로를 통한 항염 활성을 확인한 바 있다. 체내의 면역관련 작용 메커니즘이 매우 복잡하며 상호 밀접한 관련을 가지고 있으므로, 각 탐색계에서 선발한 활성물질은 반드시 동물모델에서 총체적인 항염증 활성을 나타내어야 그 의미가 있다고 할 수 있다. 급성 염증모델에서 배초향 추출물의 항염활성을 측정한 결과, 다음 table 7 및 figure 11과 같이 배초향 추출물은 카라기난-유도 급성염증 동물모델에서 용매 투여 2시간 이후부터 매우 강한 항염증 활성을 나타내었으며, 측정한 5시간 동안 부종 억제 효과가 지속되었다. 상기한 *in vitro* 염증인자 탐색계에서 배초향 주성분 들이 다양한 경로에서 활성을 나타낸 결과로 미루어 볼 때, 배초향

추출물이 강력한 *in vivo* 항염 활성은 충분히 예상된 결과라고 할 수 있다.

Table 7. Anti-inflammatory activity of the extract of *Agastach rugosa* in carrageenan-induced acute edema model.

sample	duration after treatment (hr)	volume of edema (%)	inhibition of edema (%)
	0	100	-
extract of	1	100	-
<i>A. rugosa</i>	2	45.8	54.2**
(200 mg/kg,	3	63.4	36.6*
p.o.)	4	60.8	39.2*
	5	68.4	31.6*

** P < 0.01, * P < 0.05

3-6. 배초향 추출물의 *in vivo* 항동맥경화 활성

본 연구는 동맥경화성 병변의 발달이 내피세포의 활성화, 혈관대식세포 및 T 세포의 이동 및 활성화 등 전형적인 염증 반응에 근거하여 발달하게 된다는 이론(Russel R., New England J. of Med. 340(2), 115-126, 1999)에 근거하여, 항염 활성을 나타내는 배초향 추출물이 동맥경화성 병변을 유도한 동물모델(저밀도 지단백질-low density lipoprotein, LDL-유전자 결핍 동물모델: LDLR^{-/-} mice)에서 병변을 감소시킬 수 있는지를 확인하고자 한 것이다. 먼저, 배초향 추출물을 첨가한 처리군은 8주의 실험 기간동안 무처리군과 비교할 때 섭취량 및 체중의 변화가 전혀 나타나지 않았으므로 배초향 추출물에 의한 부

정적인 생리적 영향은 없었다고 할 수 있다.(Table 8)

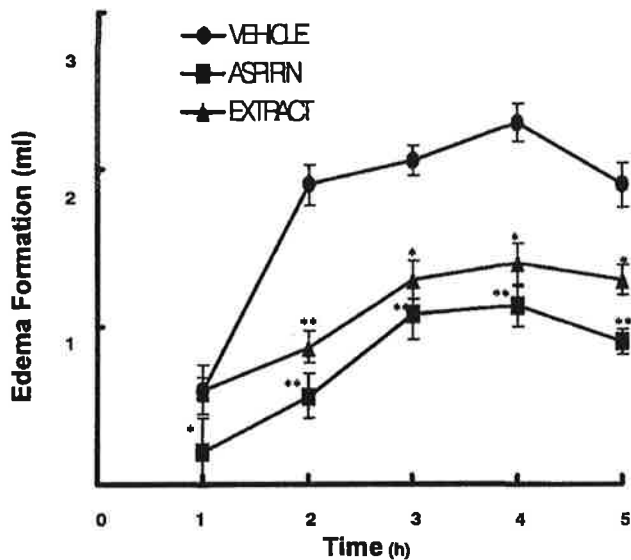


Figure 11. Effect of *Agastache rugosa* extract (200mg/kg, p.o., (●) and aspirin (50mg/kg, i.p., (▲) on time-dependent increase (0 to 5h) in the rat hind paw following carrageenin administration (■). Each point represents the mean value obtained from seven rats. * P<0.05, ** P<0.01

Table 8. Comparisons body weight of animals between control (no treated) and extract of *A. rugosa* treated.

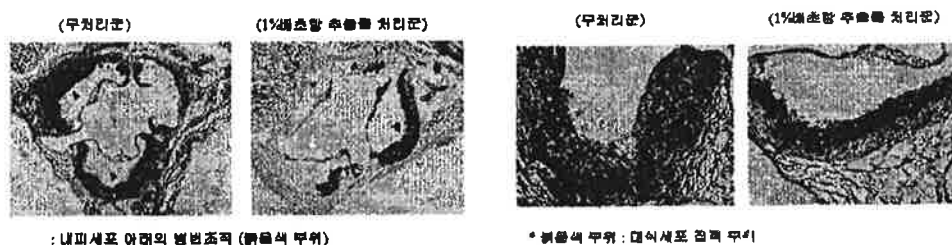
animals	body weight (g)		
	0 week	4 week	8 week
control (no treated)	16.8 ±1.2	19.8 ±1.4	21.1 ±1.6
treated 1% extract of <i>A.</i> <i>rugosa</i> in bait	16.6 ±1.1	19.7 ±1.1	20.8 ±1.8

또한, 배초향 추출물의 동맥경화성 병변에 대한 억제 효과에서는, 0.1% 및 1%의 배초향 추출물을 함유한 사료를 섭취한 실험군이 무처리군에 비하여 병변 크기가 각각 23.% 및 46.6% 감소한 결과를 나타내었으며 (Table 9), 이를 심장동맥의 단면 조직을 염색하여 병변 (괴사조직)의 크기와 병변 조직의 대식세포를 염색하여 관찰한 결과, 1% 배초향 추출물 처리군은 무처리군보다 병변조직의 면적과 대식세포의 집적도가 현저하게 감소되었음을 확인하였다 (Figure 12).

Table 9. Anti-atherogenic activity of the extract of *A. rugosa*

sample	concentration (%)	atherogenic lesion (μm^2)	inhibition (%)
control	-	304644.0 \pm 76602.6	-
extract of <i>A. rugosa</i> in bait	0.1	232120.3 \pm 32534.04	23.8
	1.0	162629.6 \pm 28362.1	46.6*

* P < 0.01



(A)

(B)

Figure 12. Effect of *A. rugosa* extract on atherosclerotic lesions in *Ldlr*^{-/-} mice fed a cholesterol diet for 8 weeks. Immunohistochemical staining of cross section of aortic valves (x 100) in hearts from (A) total lesion area, (B) macrophage marker MOMA-2.

한편, 틸리아닌의 동맥경화성 병변에 대한 억제 효과에서는, 1% 틸리아닌을 함유한 사료를 섭취한 실험군에서는 무처리군에 비하여 병변 크기가 각각 41.9 % 감소한 결과를 나타내었다. (Table 10) 그리고, 심장동맥의 단면 조직을 염색한 결과, 염증 반응에 의한 병변 (괴사조직)의 크기가 무처리군에 비하여 1% 틸리아닌 첨가 처리군에서 현저하게 감소되었음이 관찰되었다. (Figure 13)

본 연구로서 동맥 내피세포 아래에서 대식세포 등 면역세포의 집적 및 염증반응으로 동맥경화성 병변이 발달하는 과정에서 배초향 추출물은 항염증 활성으로 병변의 발달을 현저하게 감소시키는 사실을 확인하였으며, 배초향 성분 중 틸리아닌이 주 활성성분임을 규명하였다. 따라서, 배초향 추출물 및 틸리아닌은 *in vitro* 및 *in vivo* 항염 활성을 나타내며, 이에 근거하여 항동맥경화 활성을 나타내므로 배초향 추출물 및 틸리아닌은 각종 염증관련 질환과 동맥경화 및 이로 인한 순환기 질환의 예방, 치료 (보조)제 등으로서 기능성의약품과 건강보조식품에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대하고 있다.

Table 10. Anti-atherogenic activity of tilianin from the extract of *A.*

rugosa

sample	concentration (%)	atherogenic lesion area (μm^2)	inhibition of lesion (%)
control	-	592981.4 \pm 98784.2	-
tilianin	1.0	344277.7 \pm 186833.8	41.9**
lobastatin*	1.0	291442.0 \pm 96927.8	50.9***

* positive control, ** $P < 0.003$, *** $P < 0.0002$

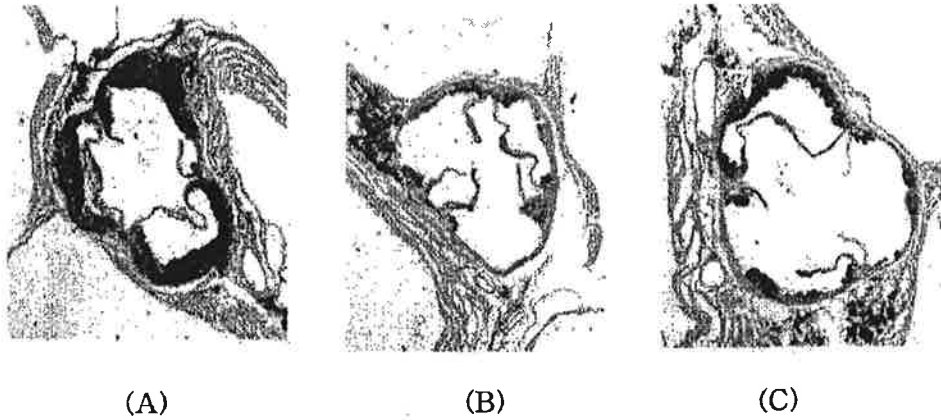


Figure 13. Effect of tilianin from *A. rugosa* extract on atherosclerotic lesions in *Ldlr*^{-/-} mice fed a cholesterol diet for 8 weeks. Representative cross section of aortic valves (x 100) in hearts from (A) a control group, (B) 1% lovastatin and (C) a 1% *A. rugosa* extract-treated group.

제 4절 결론

배초향의 과도한 면역 반응에 대한 조절 활성을 규명하기 위하여 추출물 및 이로부터 분리한 성분들을 대상으로 *in vitro* 및 *in vivo* 항염 활성을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 배초향 추출물은 *in vitro* 탐색계에서 보체계의 활성화, 세포부착물질(ICAM-1, VCAM-1)의 발현에 뛰어난 억제 활성을 나타내었다.
2. 배초향의 성분 중 항보체 활성을 나타낸 성분으로 불포화지방산류, phytosterol류, oleanolic acid 등 triterpenoid류, rosmarinic acid 등의 phenylpropanoid류를 분리하였다.
3. 배초향 성분 중 ICAM-1 발현 저해 활성을 나타낸 성분으로 불포화지방산류, acacetin, tilianin 등의 flavonoid류를 분리하였다.
4. 배초향 성분 중 tilianin은 함량이 가장 높은 성분으로서, 세포부착물질(ICAM-1, VCAM-1), NO 생성, iNOS 및 IL-6의 mRNA 발현 등 염증 반응과 관련 있는 다양한 경로에서 강한 항염 활성을 나타내었다.
5. 배초향 추출물은 carrageenan 유도 급성 염증 동물모델에서 뛰어난 항염 활성을 나타내었으며, 이는 배초향의 주요 성분들이 다양한 경로의 *in vitro* 항염 탐색계에서 활성을 나타내었기 때문에 동물모델에서의 항염활성 경로를 제시한 것이라 할 수 있다.
6. 배초향 추출물과 주성분 tilianin은 고지혈증 동물모델에서 동맥경화성 병변을 현저하게 감소시켜 염증반응에 근거한 항동맥경화 활성을 최초로 제시하였다.
7. 본 연구의 결과로서 배초향 추출물의 활성에 관한 특허(제목: 항염증 활성 및 항동맥경화 활성을 나타내는 배초향 추출물, 출원번호 2001-39574)와 주성분 tilianin의 활성에 관한 특허(제목: 항염증 활성 및 항동맥경화 활성을 나타내는 티리아닌, 출원번호 2001-39575)를 출원함으로써 배초향의 가능성을 제고하였으며 배초향을 이용한 기능성 의약품과 건강 보조식품에 유용하게 사용될 수 있는 근거를 과학적으로 제시하였다는데 그 의의가 있다.

제 3장 배초향을 이용한 기능성 식품 응용연구

제 1절 서설

식생활 패턴이 서구화되면서 비만, 성인병, 노인성질환, 면역질환등이 늘어나고 산업공해 물질에 노출이 심해짐에 따라 과민성 면역계 질환이 증가하는 추세이므로 이러한 질환의 예방과 치료차원에서 생리활성 물질을 함유한 기능성 식품에 대한 관심과 수요의 잠재력이 매우 높다고 할 수 있다. 그러나 건강지향적 기능성 식품의 수요증가에 따라 과학적 근거가 없이 건강보조 식품 및 특수영양 식품이 범람하고 있어 오히려 국민의 건강을 해칠 우려가 있으므로 정확한 약리활성을 기반으로하는 기능성 식품의 개발이 절실히 요구된다고 하겠다. 한편, 소비자들이 건강식품에 대한 인식이 크게 확산되고 있고 고기능성 식품을 간편하게 섭취하려는 추세로 볼 때 맛이나 영양 기능보다는 생체조절 기능을 함유한 생리활성 성분의 기능성 식품에 대한 수요가 매우 높아질 것으로 예상된다. 따라서 농산자원을 이용한 기능성 식품 개발산업은 크게 활성화 될 것이며 다양한 종류가 기능성 식품으로 출현하게 되면 소비자의 인식수준도 높아지고 기능성 식품에 대한 정의도 한층 강화될 것으로 보인다. 이제는 막연하게 건강에 좋다는 방식으로는 “보건용식품”으로서 설득력이 없으며 정확한 과학적 근거를 제시한 기능성 식품만이 국민건강에 기여할 수 있고 소비자들의 욕구를 충족할 수 있을 것이다.

우리 조상들은 오랜 세월의 경험을 통하여 산야에 자생하는 토착식물 등 자연 환경으로부터 식품 또는 민간 의약으로 사용할 수 있는 천연 자원들을 선별, 사용하여 왔으며 그 오랜 역사만큼이나 가용자원 또한 풍부하게 확보하고 있다. 농업 생산물로부터 기능성 식품이나 약용 원료를 추출하는 사례는 많으며 이러한 기술은 비교적 용이하게 응용될 수 있으나, 특정 약용 식물이나 재배 농산물에서 새로운 효용성을 부여하고 활용도를

확장하는 등 부가가치를 창출하지 못하면 경제 개방화에 따른 전세계의 시장 경제 체제하에서는 기초 농산물로서는 도저히 경쟁력을 유지할 수 없다. 따라서 국내 토착 자원을 산업자원으로 활용할 수 있다면 자원으로서의 가치를 높임으로서 농민에게 재배 동기를 부여할 수 있고, 아울러 부가가치가 높은 가공 식품이나 의약품 소재 개발로 연계하여 할 수 있는 관련산업을 활성화 할 수 있다.

배초향은 그 지상부를 곽향(藿香)이라 하여 한방에서는 “療風 水毒腫 去惡氣 止霍亂 治脾胃吐逆”에 중요한 약재로 사용하고 있으며, 지하부(藿香根)는 곽란(霍亂), 구토(嘔吐), 하리(下痢), 혈기통(血氣痛) 등의 치료에, 배초향 지상부를 증류하여 얻은 정유성분(藿香露) 등은 서열(暑熱)에 의한 기체(氣滯), 흉번(胸煩), 오심(惡心) 등의 치료에 사용한다. 그리고 민간에서는 잎(방아잎)을 추어탕 등 각종 찌개의 풍미재료로 사용하고 있으며 그 꽃은 밀원(蜜源)으로 이용하고 있다. 이와 같이 배초향은 식물 전 부위를 식용 또는 약용으로 사용하고 있어 기능성 식품 소재로서 곧바로 산업용 자원으로 활용할 수 있는 농산자원이라 할 수 있다.

본 연구자들은 화분, 버섯, 고추, 느타리, 구기자, 치커리, 황기, 당귀, 마늘 및 양파 등 10여종 이상의 식품재료를 이용하여 기능성 음료, 농축차, 조림제품 등 다양한 가공식품을 개발한 경험을 갖고 있으며 이를 토대로 배초향의 기능성 성분을 함유한 가공식품을 개발할 능력을 갖추고 있다. 본 연구과정에서는 배초향의 추출물 및 전초를 이용하여 기능성 음료, 차류, 향신료, 후리가게 등 배초향을 식품 소재로서 개발하여 제 1세부과제에서 근거로 제시할 생리활성을 기반으로 하는 기능성 식품을 개발하고자 한다.

제 2절 재료 및 방법

2-1. 기능성 식품을 위한 전처리

2-1-1. 배초향 부위별 기초성분 분석

가) 일반성분 분석

선별된 배초향의 꽃, 잎, 줄기를 60 mesh 크기 정도로 분쇄하여 분석을 수행하였다. 수분함량은 105℃ 상압가열 건조법, 조지방 함량은 soxhlet 추출법, 조단백질 함량은 semi-micro kjeldahl법 (Kjeltec 1030 Auto Analyzer, Tecator, Sweden)으로 측정된 질소량에 질소계수 6.25를 곱하여 산출하였으며, 조회분은 직접회화법으로 측정하였다. 또한 총량에서 조회분, 조단백질, 조지방의 양을 뺀 값을 탄수화물 양으로 나타내었다.

나) 아미노산 조성

배초향 꽃, 잎, 줄기의 3가지 부위별 시료의 아미노산 조성은 pico-tag 방법에 따라 시료를 전처리한 후 HPLC로 분석하였다.

다) 무기질 조성

무기질 분석을 위한 배초향 부위별 시료의 분해는 AOAC방법에 따라 실시하였다. 각 원소의 표준 용액 농도를 0.1 ppm, 1.0 ppm, 10.0 ppm의 3 수준으로 조제하여 표준 검량 곡선을 작성하였으며 매 10개의 시료 측정후 검량곡선을 재 작성하여 실험하였다.

2-1-2. 전처리 조건별 추출효율 및 물성조사

가) 추출물 제조

식용의 추출물 소재를 제조하는 것이 목적이므로 추출용매를 증류수, 에탄

을 수용액 및 소금물 등 3종을 선정하였으며, 배초향 꽃, 잎, 줄기 부위의 3가지 시료에 대하여 농도 및 추출온도별로 추출시간에 따른 각각의 추출곡선을 작성하여 추출효율을 조사하였다.

나) 추출물의 고형분 함량 및 수율

각각의 조건별로 추출된 열수 추출물, 에탄올추출물, 소금물추출물들을 증발접시에 담아 105℃에서 항량이 될 때까지 건조한 후, 무게를 측정하여 각 추출물들의 정확한 절대적인 고형분 농도를 구하였다. 소금물추출물의 경우, 항량후 잔존 소금의 양을 제외하고 고형분함량을 계산하였다.

$$\text{추출수율(\%)} = \frac{\text{고형분함량(g/mL)} \times \text{추출물의 총부피(mL)}}{\text{사용된 시료의 건물량(g)}} \times 100$$

다) pH 및 산도

추출물제조 방법에 따라 제조한 27가지의 열수추출물, 18가지의 에탄올추출물, 12가지의 소금물추출물에 대하여 pH meter (Orion SA520, USA)로 직접 pH를 측정하였다. 산도는 가장 낮은 pH를 나타낸 시료에 대해서 1.0 N의 NaOH용액으로 pH가 8.1(±0.2)이 될 때까지 적정한 후, 소비된 NaOH 표준용액의 양을 아래와 같이 계산하여 초산 (acetic acid)의 양으로 환산(1.0 N NaOH 표준용액 1 mL = 초산 0.06 g)하였다.

$$\text{산도(\%)} = \frac{0.06 \text{ g} \times \text{소비된 1.0 N NaOH의 mL 수}}{\text{시료의 무게(g)}} \times 100$$

라) 색도

선정한 용매 및 추출온도 별로 제조한 추출물 시료들을 0.5% 고형분 함량으로 조절한 후 색차계 (Color and color difference meter, HunterLab

ColorQueswt II, USA)를 사용하여 명도 (L, lightness), 적색도 (a, redness), 황색도 (b, yellowness)를 측정하였다. 또한 배초향 잎을 기준으로 열수추출의 경우 온도의 영향, 에탄올과 소금물은 용매 농도의 영향, 동일 온도에서 각각의 용매종류에 따른 색차 (ΔE^*ab)를 구하여 추출조건에 따른 색의 변화를 조사하였다. 이때 사용한 표준백색판의 명도, 적색도, 황색도는 각각 99.44, -0.25, 0.51 이었다.

마) 유리당

선정한 용매 및 추출온도 별로 제조한 14종의 추출물 시료들을 0.5% 고형분 함량으로 조절한 후 0.25 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC (carbohydrate analysis column, 300 \times 3.9mm ID, Waters; 80% acetonitrile, 1.5 mL/min, RI detector; standard: fructose, sucrose, glucose)로 유리당 함량을 분석하였다.

2-1-3. 관능검사

가) 전자코를 이용한 향기성분 분석

Fig. 14과 같은 시스템으로 구성된 전자코(AromaScan A32, Aromascan Co. U.K)를 사용하여 추출물제조 방법에 따라 제조된 27가지의 열수추출물, 18가지의 에탄올추출물, 12가지의 소금물추출물들 중에서 예비실험을 통하여 14가지 추출물시료를 선별하고, 32종의 전자코에 장착된 센서가 가장 민감하게 반응하는 고형분 농도인 0.5°Bx로 모두 동일하게 조절한 뒤 향기성분의 변화를 조사하였다. 측정된 향기성분 데이터들은 배초향의 꽃, 잎, 줄기 등의 시료부위에 따른 차이분석, 추출온도에 따른 차이분석, 추출용매에 따른 차이분석 등으로 나누어 실시하였다.

나) 관능검사

배초향의 꽃, 잎, 줄기 등의 부위별, 추출온도별, 추출용매별로 추출된 배초향 추출물들의 관능적 특성 차이를 간단 명료하게 알아보았다. 전체 시료 중

에서 앞의 경우 100℃, 80℃, 60℃ 열수추출물, 80℃의 50% 에탄올추출물, 100℃의 0.5% 소금물추출물 등 5종, 꽃 및 줄기의 80℃ 열수추출물 2종 등 총 7가지를 선별하여 고형분 농도를 0.5%Bx로 동일하게 조절한 후 관능적 특성을 비교 분석하였다. 이때 추출물들의 맛과 냄새에 대한 profile test를 먼저 실시하여 박하 맛 (mint taste), 한약 맛 (medicinal herb taste), 단 맛 (sweetness), 박하 냄새 (mint odor), 풀 냄새 (grassy odor) 등의 검사항목을 결정하고 각각의 항목에 대하여 훈련된 관능검사 요원 20명을 대상으로 5점 척도법에 의해 정량적 묘사분석을 실시하였다.

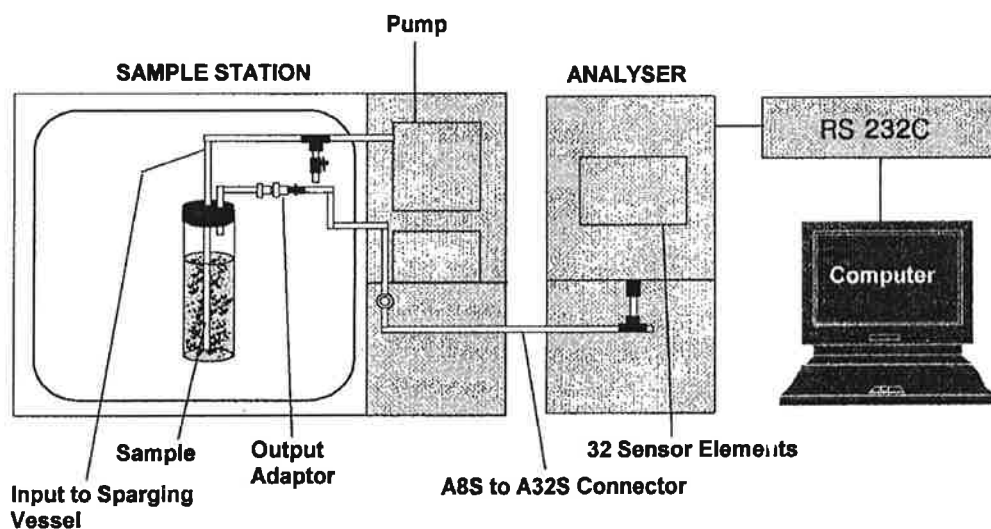


Figure 14. System configuration for sparging analysis by the AromaScan.

2-2. 배초향 추출물을 이용한 기능성 음료 제조

배초향 농축물의 기능성 음료 제조를 위한 농축액 색도, 농축액 점도를 조사하여 적정 농축비를 결정하고자 하였다. 아울러 기능성 음료의 첨가 재료로서 11종의 생약재 (생강, 박하, 계피, 구기자, 오미자, 산수유, 당귀,

등글레, 결명자, 감초 및 대추) 추출물에 대한 관능적 특성 조사결과, 박하 는 배초향과 향이 비슷하면서 강하고 맛은 배초향보다 훨씬 부드러웠다. 감 초 추출물의 경우 단맛이 뒤에 강하게 남는 특성이 있었으며, 생강 추출물은 생강 특유의 아린맛이 있었다. 계피는 특 쓰는 맛과 개운한 맛이 향과 함께 강하게 나타났으며 오미자는 약간의 추출로도 강한 신맛을 느낄 수 있었고, 대추는 약간의 단맛과 부드러운 맛이 있었다. 그밖에 당귀와 천궁 및 구기자 는 한약 냄새와 맛이 강하게 나타났다. 따라서 배초향 음료의 재료로서 배초 향의 맛과 향을 masking 할 수 있는 생약재로서 관능적 예비실험 결과 당귀 나 천궁 및 구기자 등은 배초향의 음료에 부합되지 않는 생약재로 판단되었 으므로 박하, 감초, 계피, 대추, 오미자, 계지 등 6종 생약재를 배초향 음료 제조에 첨가할 생약재로서 선정하였으며 관능 검사를 토대로 각 성분의 배합 비를 결정하고자 하였다.

한편, 생약재 추출물의 음료 제조시 기호도를 증진시키고 보관 저장성을 높이기 위하여 당 및 산미료 첨가가 필요한데 이에 필요한 당과 산미료의 종 류 및 농도별로 조합하여 관능 검사를 통하여 그 적정비율을 결정하고자 하 였다.

2-3. 과립차 제조 공정

배초향 농축물을 이용한 과립차 제조는 기본적으로 배초향 농축물 제조시 설탕을 제외한 각 추출물을 대상으로 음료제조시 조성과 동일하게 배합하였 으며, 이를 과립차 제조에 필요한 추출물의 물성조절, 과립화 및 건조조건을 조사하였다.

2-4. 엽차류 개발을 위한 제조 공정

수확 직후 배초향 전체 식물에서 꼭지를 제거한 잎을 수거하여 수세한 후, 40℃에서 열풍 건조하여 수분함량이 5.8%로 맞추었다. 본 시료를 차류로 개발

하기 위하여 배초향 잎의 볶음 조건별 시각적 기호도 및 관능 검사를 실시하였다. 즉, 배초향의 최적 볶음조건은 맛, 향, 색깔을 위주로 평가하였으며 나중에 현미나 등굴레를 혼합할 것을 고려하여 혼합시 가장 잘 어울릴 것으로 평가되는 배초향의 향과 색깔에 주안점을 두었다. 위의 방법으로 전처리한 배초향 잎을 그대로 엽차용으로 사용했을 때 배초향 특유의 화한 향은 강하게 나타나지만 첨가량이 조금씩 증가할수록 짝짝한 맛이 강하게 남고, 풀 냄새로 인하여 기호성이 크게 떨어졌다. 그래서 배초향 잎을 그대로 사용하는 것보다는 약간 볶아서 구수한 풍미를 부여해 보기로 하였다. 위와 같이 열풍건조한 잎 5 g을 roaster에 넣고 170℃에서 1분, 3분, 5분 조건으로, 200℃에서는 30초, 1분, 2분의 조건으로 볶아 보았다. 이러한 조건으로 볶아진 배초향 잎 0.3 g을 80℃의 물 100 mL에 2분간 추출하여 20여명의 관능검사요원에 의한 panel discussion 방법으로 향은 박하향, 구수한 향, 풀 냄새, 탄 냄새, 매운 냄새를 5점척도법으로 평가하였고, 색깔은 옥안으로 판별이 용이하므로 옥안으로 관찰하기로 하였다.

2-5. 부재료를 혼합한 배초향 혼합차의 제조

배초향 혼합차에 사용되는 부재료로는 구수한 맛이 우러나올 수 있도록 현미나 등굴레를 사용했으며 이 부재료들의 전처리 및 소재 가공은 다음과 같이 실시하였다.

현미 : 시중에서 시판되고 있는 현미를 구입하여 roaster로 150℃에서 10분간

볶은 후 40 mesh의 크기로 분쇄하여 배초향 혼합차의 부재료로 사용하였다.

황정(등굴레) : 경동시장에서 구입하여 roaster로 170℃에서 15분간 볶은 후 40 mesh의 크기로 분쇄하여 배초향 혼합차의 부재료로 사용하였다.

2-6. 배초향을 이용한 미립형 향신료 제조 공정

차류 개발과 동일한 방법으로 시료를 제조한 후, 미립형 향신료를 개발하기 위하여 원료 소재로는 배초향 등걸 건조 잎에 25배의 70%주정을 넣고, 80℃에

서 7분간 추출한 70% 주정 추출물을 사용하여 열수 및 주정별로 추출 조건별 관능 조사, 용도별 배합비를 결정하기로 하였다.

한편, 배초향을 이용한 미립형 향신료 제조에 사용되는 원료로는 배초향의 특성과 잘 어울릴 것으로 예비 실험된 natural oil과 레몬향, 배초향 70% 주정 추출물, 주정, 증류수 등이다. natural oil 3가지(B-13789, B-13790, B-13791)와 레몬향(B-13792)은 (주)한불화농으로부터 구입하였다. 배초향 추출물은 동결 건조한 배초향 잎에 대하여 25배의 70%주정으로 추출하여 10,000 x g로 원심분리한 상등액을 사용하였고, 주정은 95%이상의 것을 사용하였다.

배초향의 좋은 향을 부향시킬 수 있고 배초향의 특성에 어울린다고 예비 선정된 natural oil중에서 B-13789는 자체에 약간의 화장품 냄새가 나고, B-13790은 가열취가 조금 느껴졌으며 B-13791은 박하향이 다른 것들보다 강하게 느껴지는 특징을 나타냈다.

위 재료들로 구성된 여러 가지 배합비에 대하여 선발된 10여명의 관능검사 요원들의 panel discussion에 의한 관능검사 방법으로 최적 배합비를 결정하였다.

2-7. 배초향 전초를 이용한 후리가게 제조 공정

후리가게 제품 개발에 사용된 배초향은 전남 남평에 있는 농업 기술원에서 2000년 10월에 수확한 것을 사용하였다. 후리가게 제조를 위한 배초향의 전처리 과정은, 수확 직후 전체 식물에서 잎만 수거하여 꼭지를 제거하고 수세한 후, 40℃에서 열풍 건조한 것, 동결 건조한 것, 4℃의 냉장고에 생 배초향 잎을 저장하는 3가지 방법으로 전처리 하였다.

한편, 대상이 되는 식품에 소량 들어가서 맛과 향을 돋구는 역할을 하는 후리가게의 특성상 맛은 짠맛이 좀 강해야 하고 단맛이나 다른 향 등은 대상 식품에 잘 어울려야 할 것으로 판단되었다. 따라서 최적 조미액 배합비의 결정은 최적 침지시간을 결정한 후 각 재료들의 첨가량을 달리하여 결정하고자 하였다.

제 3절 결과 및 고찰

3-1. 배초향의 기능성 식품을 위한 기초 조사

3-1-1. 배초향 부위별 기초성분 조사

가) 일반성분

배초향의 꽃, 잎, 줄기 부위에 대한 일반성분 분석결과는 Table 11과 같다. 단백질함량은 꽃 (16.08%)에 가장 많이 함유되어 있었으며, 회분은 잎 (12.01%)과 꽃(10.11%)의 함유량이 높았다. 지방의 경우, 잎에 9.54%로 가장 많이 함유되어 있었는데, 이는 잎에 정유성분이 많이 함유되어 있음을 시사하는 것으로서, 예로부터 향이 강한 잎 부위를 향신료로 많이 사용되어 왔다는 사실과 연관성이 있음을 뒷받침하고 있다.

Table 11. Approximate composition of flower, leaf and stem of *Agastache rugosa*. (Unit : % dry basis)

Part	Carbohydrate	Fat	Protein	Ash
Flower	70.75	3.06	16.08	10.11
Leaf	66.84	9.54	11.61	12.01
Stem	93.37	0.01	2.64	3.98

나) 아미노산 함량

배초향의 꽃, 잎, 줄기 부위에 대한 아미노산 함량 분석결과는 Table 12와 같다. 총아미노산 함량은 단백질 함량과 관련하여 꽃이 가장 많이 함유하고 있었으며, 특징적으로 모든 부위에서 글루탐산을 가장 많이 함유하고 있었다. 잎 부위의 아미노산 조성에서는, 로이신 460.3 mg%, 페닐알라닌 598.7 mg%, 라이신 460.3 mg%, 발린 629.7 mg%, 이소로이신 518.2 mg%, 트레오닌 504.0 mg% 등, 전반적으로 다른 아미노산에 비해 필수아미노산의 함량이 높은 것으로 나

타났다.

Table 12. Amino acids composition of flower, leaf and stem of *Agastache rugosa* (Unit : mg%)

Amino acid	Flower	Leaf	Stem	Amino acid	Flower	Leaf	Stem
Asp	1256.3	954.5	206.9	Cys	0.0	0.0	0.0
Ser	887.9	562.4	141.4	Tyr	450.1	365.8	51.1
Glu	1485.1	1071.9	296.7	Val	817.5	629.7	135.8
Gly	847.0	623.0	131.1	Met	57.3	51.3	0.0
His	774.7	190.5	41.4	Lys	608.2	460.3	117.1
Thr	636.5	504.0	117.8	Isoleu	674.4	518.2	106.0
Arg	1318.6	557.8	96.5	Leu	1189.0	964.9	189.0
Ala	276.0	626.6	141.4	Phe	716.3	598.7	114.0
Pro	709.8	531.6	137.8				
Total	12704.7	9211.2	2024.0				

다) 무기질 조성

배초향의 꽃, 잎, 줄기의 회분중 6가지 주요 무기질의 함량을 살펴본 결과는 Table 13과 같다. 잎의 회분함량은 12.01%로 가장 높았고, 줄기는 3.98%로 가장 낮은 함량이었는데, 6가지 무기질중 모든 부위에서 K의 함량이 가장 높았고, Fe 함량이 가장 적게 나타났다.

Table 13. Major minerals composition of ash of flower, leaf and stem of *Agastache rugosa*. (Unit : mg%)

Part	Na	Ca	Fe	P	K	Mg
Flower	1452.05	1097.80	274.00	6927.60	25831.70	6007.83
Leaf	700.92	1242.70	129.85	3574.42	38257.47	4063.11
Stem	1794.04	9459.46	106.24	3112.77	29822.93	2730.66

3-1-2. 전처리 조건별 추출효율

가) 배초향 꽃, 줄기 및 잎별 열수추출 방법에 의한 추출효율

온도 3항 (60℃, 80℃, 100℃)과 추출용매량 3항 (꽃, 잎: 25배, 30배, 35배, 줄기: 10배, 12.5배, 15배)을 조합하여 열수 추출시 효율을 고려한 적정 용매량과 추출온도를 설정하고자 하였으며 그 결과는 table 14와 같다.

열수 추출시 온도는 높을수록, 사용한 용매량이 많을수록 추출되는 양이 증가하였다. 그러나 제품화 과정시 온도 증가나 용매량 증가는 추출물을 소재화할 때 추출물 전처리비용이 상승하는 등 생산 단가와 밀접한 관계가 있으며, 활성물질이 가온상태에서 변성이 일어날 가능성이 있으므로, 추출물 또는 활성물질의 안정성 및 조성변화를 확인한 후에 최적 온도 설정을 결정할 필요가 있다고 판단하였다.

Table 14. Extraction yield of flower, leaf and stem of *Agastach rugosa* by water mixture ratio and temperature. (Unit: %)

Temp.	Solvent volume (×time)	Flower	Solvent volume (×time)	Leaf	Solvent volume (×time)	Stem
100℃	35	19.75	35	26.98	15	7.27
	30	17.47	30	26.30	12.5	5.67
	25	17.33	25	21.83	10	4.73
80℃	35	18.29	35	26.19	15	7.04
	30	17.36	30	25.80	12.5	7.59
	25	15.12	25	24.92	10	4.62
60℃	35	12.40	35	25.85	15	7.18
	30	11.91	30	24.90	12.5	6.01
	25	11.79	25	18.83	10	5.17

나) 배초향 꽃, 줄기 및 잎별 에탄올 추출방법에 의한 추출효율 결과

온도 2항 (60℃, 80℃)과 에탄올 함량 3항 (25%, 50%, 75%)을 조합하여 추출시 효율을 고려한 적정 에탄올 함량과 추출온도를 설정하고자 하였으며 그 결과는 table 15와 같다.

추출 효율은 꽃과 잎의 경우 추출온도가 높을수록 좋았으나 줄기의 경우 오히려 60℃에서 높게 나왔다. 그러나 전반적으로 추출효율은 추출 온도보다 에탄올 함량에 따라 큰 변화가 있었다. 즉, 꽃과 잎의 경우 에탄올 50%가 효율이 가장 높았고, 줄기의 경우 오히려 에탄올 함량이 낮을수록 추출효율이 높은 결과를 나타내었다. 한편, 에탄올을 첨가하면 지용성 성분의 추출효율이 증가하여 추출성분의 조성에 영향을 미치므로 활성성분의 함량조사 및 경제성을 고려하여 첨가여부를 최종적으로 결정하고자 하였다.

Table 15. Extraction yield of flower, leaf and stem of *Agastache rugosa* by ethanol concentration and temperature.* Unit: %

Temp.	Ethanol Conc. (%)	Flower	Leaf	Stem
80℃	75	17.73	28.02	5.83
	50	21.06	28.76	6.69
	25	15.93	26.07	7.04
60℃	75	13.13	20.71	6.28
	50	17.84	28.26	6.84
	25	14.05	25.58	7.02

* Solvent volume of flower was fixed to 30 times, leaf to 25 times and stem to 12.5 times.

다) 배초향 꽃, 줄기 및 잎별 소금물 추출방법에 의한 추출효율 결과

간수의 사용은 추출물의 안정화와 맛을 결정하는 조건으로서 소금 첨가시 추출 효율을 조사하였으며 그 결과는 table 16과 같다. 추출 효율은 처리한 소금물 농도에 큰 영향을 받지 않았으나, 활성이 크게 저하된 결과를 감안하여 최종제품의 특성에 따라 첨가 여부를 결정하고자 하였다.

라) 배초향 부위별 추출물의 pH 및 산도

추출 조건에 따른 배초향 추출물의 pH나 산도를 측정한 결과는 table 17와 같다. 추출물의 전반적인 pH는 거의 중성이나 약산성의 범위로 나타났으며, 추출용매의 종류, 추출온도, 부위별에 따른 pH의 변화는 크지 않았다. 열수추출

물이 60℃인 경우, pH가 4.99 로 가장 낮았으나 이 경우도 산도를 측정한 결과 초산으로 환산할 때 0.034%에 불과하므로 배초향에는 산성물질들이 매우 적게 함유됨을 알 수 있었다.

Table 16. Extraction yield of flower, leaf and stem of *Agastache rugosa* by NaCl concentration and temperature*

Temp.	NaCl Conc. (%)	Flower	Leaf	Stem
100℃	1.0	19.54	29.77	7.77
	0.5	20.15	28.53	6.93
80℃	1.0	15.38	26.73	6.95
	0.5	15.64	24.54	6.33

* Solvent volume of flower was fixed to 30 times, leaf to 25 times and stem to 12.5 times.

Table 17. pH of *Agastache rugosa* extracts by various extraction conditions

Extraction Temp.	Solvent*	pH of		
		Flower	Leaf	Stem
100℃	Water	6.57	6.58	6.41
80℃	Water	6.96	6.52	4.99
60℃	Water	7.63	6.51	5.77
80℃	75% EtOH	7.29	6.74	6.35
	50% EtOH	7.14	6.90	6.59
	25% EtOH	6.97	6.73	6.66
100℃	1.0% NaCl	6.80	7.00	6.06
	0.5% NaCl	6.68	6.74	6.18

* Solvent mixture ratio is 30 times for flower, 25 times for leaf and 12.5 times for stem.

마) 배초향 추출물의 색도

배조항 부위별 추출물의 색도와 색차를 측정된 결과, 전반적으로 꽃, 잎, 줄기의 순서로 명도와 황색도가 감소하였으며, 특히, 꽃과 잎은 평균 50 이하의 명도와 30이하의 황색도를 갖는 진한 갈색을 나타내었다. 추출 조건별로는, 열수추출물에서는 80℃ 잎의 경우 다른 온도의 경우보다 명도와 황색도가 높았고 꽃은 100℃의 경우가 명도와 황색도가 가장 높았으며, 줄기는 온도가 증가할수록 명도가 감소함을 나타내었다. 한편, 용매의 종류에 따른 색차는 잎 추출물을 기준으로 보았을 때 에탄올 농도가 증가함에 따라 열수 추출물과 현저한 차이를 나타내었다. (Table 18, 19)

Table 18. L, a and b value of *Agastache rugosa* extracts by various extraction condition

Extraction Temp.	Solvent ¹⁾	Part	L	a	b
100℃	Water	Flower	30.16	15.32	18.61
		Leaf	45.38	18.39	27.58
		Stem	57.66	7.77	28.42
80℃	Water	Flower	21.39	16.45	13.68
		Leaf	48.87	18.34	29.95
		Stem	62.92	6.23	28.35
60℃	Water	Flower	21.76	18.14	13.93
		Leaf	45.00	18.72	27.81
		Stem	68.50	5.52	28.64
80℃	75% EtOH	Flower	57.12	5.13	33.76
		Leaf	63.10	5.93	38.01
		Stem	79.19	-6.73	34.66
	50% EtOH	Flower	41.63	19.96	26.44
		Leaf	52.64	18.09	32.74
		Stem	75.47	2.65	32.65
	25% EtOH	Flower	40.69	23.87	25.91
		Leaf	50.41	21.08	31.40
		Stem	70.83	5.97	32.42
100℃	1.0% NaCl	Flower	40.70	20.55	25.33
		Leaf	44.31	17.99	26.97
		Stem	63.24	5.61	27.90
	0.5% NaCl	Flower	40.48	20.74	25.26
		Leaf	47.09	17.81	28.67
		Stem	66.02	5.20	29.54

¹⁾Solvent mixture ratio is 30 times for flower, 25 times for leaf and 12.5 times for stem.

Table 19. ΔE value of leaf extracts of *Agastache rugosa* by various extraction conditions

Extraction condition	Extraction condition	ΔE
Hot water extract at 100°C	Hot water extract at 60°C	0.542
Hot water extract at 80°C	Hot water extract at 60°C	8.594
75% EtOH extract at 80°C	25% EtOH extract at 80°C	285.905
50% EtOH extract at 80°C	25% EtOH extract at 80°C	12.966
1.0% NaCl extract at 100°C	0.5% NaCl extract at 100°C	5.702
Hot water extract at 100°C	1.0% NaCl extract at 100°C	1.602
Hot water extract at 100°C	0.5% NaCl extract at 100°C	3.235
Hot water extract at 80°C	75% EtOH extract at 80°C	233.202
Hot water extract at 80°C	50% EtOH extract at 80°C	11.617
Hot water extract at 80°C	25% EtOH extract at 80°C	11.150

바) 배초향 부위별 유리당 분석

배초향의 꽃, 잎, 줄기별로 열수추출물, 에탄올추출물, 소금 추출물중 대표적으로 선별하여 유리당 함량을 조사한 결과는 table 20과 같다. 부위와 관계 없이 열수 및 소금 추출물에서는 과당, 포도당, 자당이 전혀 검출되지 않았으며, 함량이 가장 높은 줄기부위의 50% 에탄올추출물에서도 과당 0.0355%, 포도당 0.0293% 정도로 매우 소량으로 유리당을 함유함을 알 수 있었다.

3-1-3. 관능검사

가) 전자코를 이용한 향기성분 분석 결과

배초향 꽃, 잎, 줄기 추출물시료의 고형분함량을 0.5%로 조절한 뒤 전자코로 추출 조건에 따른 향기성분의 변화를 조사하였다. 배초향 잎 추출물들의 향기 강도 분포를 추출온도별로 32개의 센서에 대한 저항변화 (resistance change) 값으로서 2차원적으로 판별 분석한 결과, 100°C추출물은 다른 추출물들의 측정치들과 뚜렷하게 분별화 (grouping)되어 분포하고 있고, 품질특성값 (quality factor)이 2.0이상으로 나타나, 추출온도에 따라 추출물들간의 향기 차이가 있

다는 것을 분명히 나타내주고 있다 (Fig 15, Table 21). 본 결과를 관능검사 결과와 연계하여 보면, 온도가 증가할수록 구체적으로 박하냄새, 박하맛, 한약맛 등이 증가하는 차이가 있다고 판단하였다. 80℃ 온도에서 추출한 배초향 열수추출물들의 꽃, 잎, 줄기의 부위에 따른 향기성분의 변화를 2차원적으로 판별분석한 결과, 꽃, 잎, 줄기 각각의 측정치들은 뚜렷하게 분별화가 되어 분포하고 있으며, 품질특성값도 2.0이상으로 나타나, 배초향 부위에 따라 추출물들의 향기 차이가 있는 것으로 판단하였다 (Fig. 16, Table 21). 관능검사 결과와 연계하여 보면, 박하냄새나 박하맛은 잎추출물에서 가장 강하고, 풀냄새는 꽃추출물에서 가장 강하였으며, 한약맛은 잎과 꽃추출물이 가장 강하였다. 단맛의 경우는 줄기에서 가장 크게 느껴지는 것으로 나타났다. 한편, 0.5% 소금물로 부위별 추출물을 제조하여 향기성분의 차이를 측정한 경우에도 열수추출물에서와 비슷한 결과를 얻었으며, 단, 열수추출물과는 달리 소금물추출물은 꽃과 줄기 부위간의 향기 차이는 없는 것으로 나타났다

Table 20. Free sugar contents of *Agastache rugosa* extracts by various extractcondition

Extraction Temp.	Solvent	Part	Content (%)		
			Fructose	Glucose	Sucrose
100℃	Water	Flower, Leaf, Stem	- ¹⁾	-	-
80℃	Water	Leaf	-	-	-
60℃	Water	Leaf	-	-	-
80℃	75% EtOH	Leaf	0.0019	0.0080	-
		Flower	0.0045	0.0009	-
		Leaf	0.0010	0.0027	-
	25% EtOH	Leaf	0.0012	0.0065	-
100℃	1.0% NaCl	Leaf	-	-	-
	0.5% NaCl	Flower, Leaf, Stem	-	-	-

¹⁾Not detected

추출용매별 배초향 잎 추출물들의 32개의 센서에 대한 향기 강도 분포를 2차원 분석한 결과, 50% 에탄올 추출물은 다른 시료들의 측정치들과 분별화되어 분포하고 있으며, 품질특성값도 2.0이상으로 나타나 다른 용매추출과 향기 차이가 뚜렷한 것으로 보였으나, 센서간 반응민감도에서 크기 차이만 보일 뿐 에탄올 농도에 관계없이 동일한 패턴을 보임으로서 0.75%의 매우 낮은 농도라도 에탄올 자체의 향에 의해 시료간 향기 차이를 구별할 수 없다고 판단된다 (Fig. 17, Table 21).

Table 21. Quality factors among data sets of normalized patterns and mean odor intensity of *Agastache rugosa* extracts by various extraction conditions.

Data set*	Data set*	Quality factor
A	B	2.895
A	C	4.705
B	C	0.789
B	D	2.058
B	E	4.216
D	E	2.006
B	F	3.747
B	G	0.818
F	G	4.165
G	H	2.869
G	I	3.113
H	I	0.284

*¹) Data set as follows: A, B and C, leaf extract with hot water at 100°C, 80°C and 60°C, respectively; D, flower extract with hot water at 80°C; E, stem extract with hot water at 80°C; F, leaf extract with 50% Ethanol at 80°C; G, H and I, leaf, flower and stem, respectively, with 0.5% NaCl at 100°C.

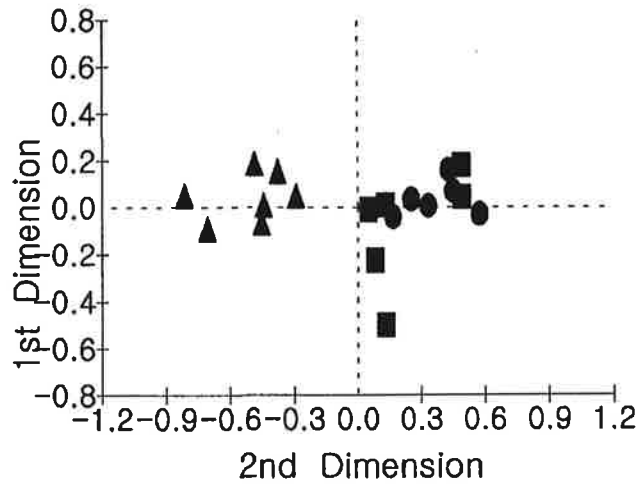


Fig.15. Multidimensional analysis on data sets of normalised patterns and mean odor intensity for hot water extracts of *Agastache rugosa* O. Kuntze at 80°C. ● : stem extract, ■ : leaf extract, ▲ : flower extract

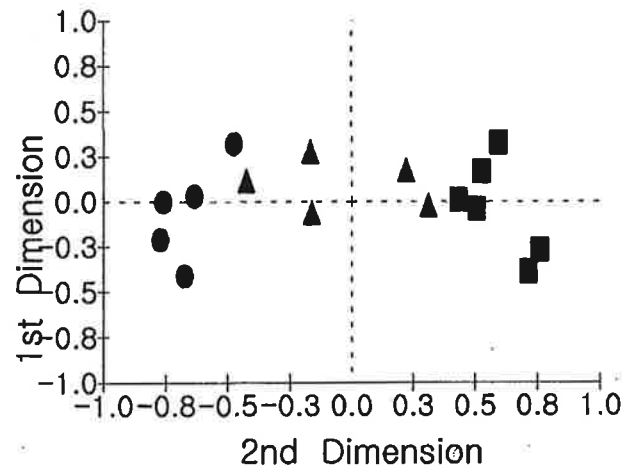


Fig.16. Multidimensional analysis on data sets of normalised patterns and mean odor intensity for leaf extracts of *Agastache rugosa* O. Kuntze with extraction temperatures. ● : hot water extract at 60°C, ■ : hot water extract at 80°C, ▲ : hot water extract at 100°C

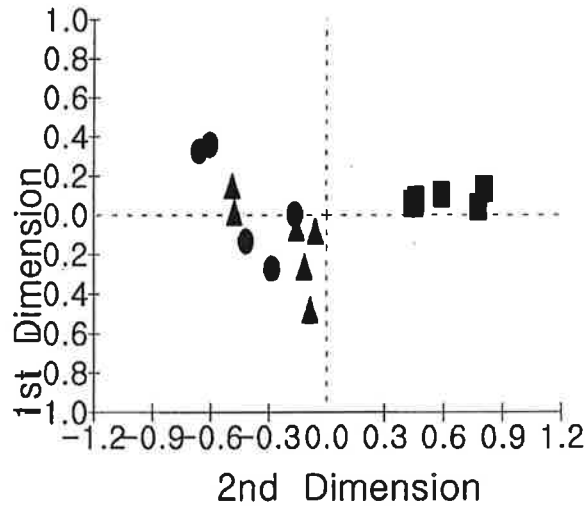


Fig.17. Multidimensional analysis on data sets of normalised patterns and mean odor intensity for leaf extracts of *Agastache rugosa* Kuntze with extraction solvents. ● : 0.5% NaCl extract at 100°C, ■ : 50% EtOH extract at 80°C, ▲ : hot water extract at 80°C

나) 관능검사 결과

추출온도, 추출부위, 추출용매에 따른 배초향 추출물들의 관능적 특성의 변화를 정량적묘사시험방법 (quantitative descriptive analysis)으로 조사한 결과는 figure 18과 같다. 잎의 경우 열수추출온도가 높을수록 박하 냄새, 박하 맛, 한약 맛 등이 증가하였고 풀냄새와 단 맛은 변화가 없었다. 80°C 추출온도에서 부위별 관능적 특성을 비교해보면, 박하 냄새나 박하 맛은 잎추출물에서 가장 강하게 나타났으며, 풀 냄새는 꽃추출물에서, 한약 맛은 잎과 꽃추출물, 단 맛은 줄기에서 가장 강하였다.

종합적으로 각 추출물들은 이화학적 특성이 각각 나름대로 독특한 특성들을 나타내기 때문에 소재로 사용하고자 하는 최종제품 (차류, 드링크, 향신료)의 특성이나 목적에 맞는 추출조건을 상기한 자료들을 참고하여 선정하고자 한다.

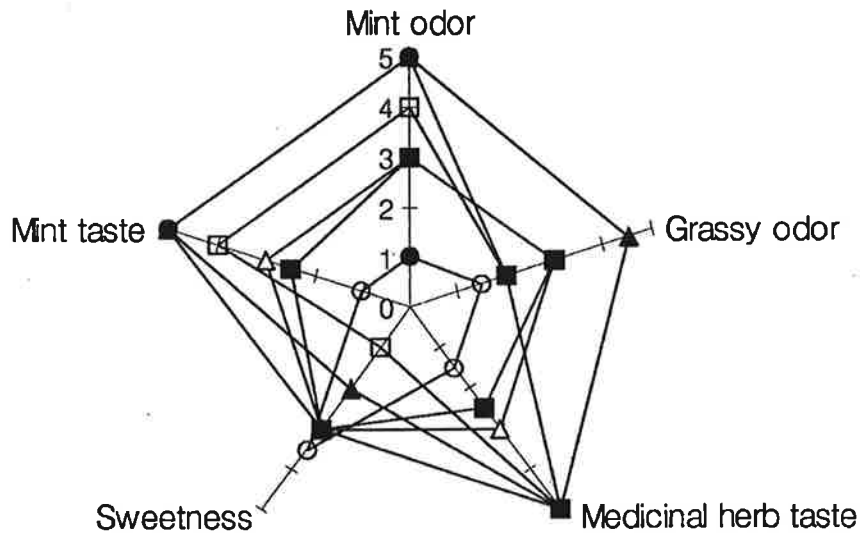


Figure 18. QDA diagram for organoleptic characteristics of various *Agastache rugosa* extracts. ◆-◆ : leaf extract with 100°C water, ▲-▲ : leaf extract with 80°C water, ○-○ : leaf extract with 60°C water, △-△ : flower extract with 80°C water, ■-■ : stem extract with 80°C water, ●-● : leaf extract with 50% Ethanol at 80°C, □-□ : leaf extract with 0.5% NaCl at 100°C.

3-2. 배초향 추출물을 이용한 기능성 음료

3-2-1. 배초향 농축물의 추출 조건

3-2-1. 색도

0.1°Bx의 배초향 추출액을 35°Bx-65°Bx 로 진공 농축한 농축액들의 색도를 측정된 결과는 Table 22와 같다. 배초향 원액의 명도와 황색도는 각각 78.68과 24.74 로 연한 황갈색을 나타내고 있으며, 농축액들의 명도와 적색도의 큰 차이가 배초향 원액과 농축액들의 색차(ΔE)에 가장 큰 영향을 미쳤다. 따라서 농축이 진행될수록 명도, 적색도, 황색도 모두 감소하여 더 어둡고 진한 검은

갈색으로 변하였으므로 (50 °C에서 농축이 진행되어도 갈변반응이 심하게 일어났음) 원래의 색깔을 유지하려면 필요한 농도까지 낮은 온도에서 단시간 내에 농축시키는 것이 좋다고 판단하였다. 한편, 농축이 진행될수록 배초향 특유의 박하 향이 많이 제거되고 탄내가 더 강해짐을 알 수 있었다.

Table 22. Determination of color of concentrated *Agastache rugosa* solution.

Concentrates	L값	a값	b값	ΔE값
추출액*	78.68	2.78	24.74	-
35 °Bx	21.29	3.03	2.32	61.60
45 °Bx	20.49	1.97	1.42	62.69
55 °Bx	19.65	1.07	0.76	63.73
65 °Bx	19.42	0.96	0.65	63.99

1)*: 배초향 추출원액을 blank로 함

3-2-2. 점도

35 °Bx-65°Bx 배초향 농축액에 대하여 25°C에서 전단속도를 0 ~2000(1/s) 까지 변화시키면서 전단응력을 측정 한 결과는 Fig. 19와 같다. 55°Bx까지는 농축정도에 따라 전단응력이 완만하게 증가하였으며 농축액의 흐름특성도 기울기로 판단할 때 추출원액은 직선상의 뉴턴(newtonian)유체와 비슷한 특성을 나타냈지만 35 °Bx이상으로 농축한 농축액들은 농축정도가 높아질수록 전단응력이 비직선적으로 증가하고 겔보기 점도는 계속 감소하는 의가소성의 유체특성을 나타내었다.

3-2-3. 부재료로 사용될 생약재 추출물 제조

배초향의 열수 추출(100°C, 15분)조건에 의한 추출물의 관능적 특성은 박하냄새, 풀냄새, 박하맛, 한약맛 및 단맛 등이 대표적으로 강하게 감지되었다.

배초향 추출물의 기호성이 떨어지는 맛과 향을 masking 하고 보완할 수 있는 생약재 및 과즙을 첨가하여 배초향 음료의 기호도를 증진시키고자 하였다. 이때 사용한 생약재 및 과즙으로서 건강, 계피, 당귀, 오미자, 모과는 서울 경동 시장에서, 매실농축물(69°Bx)은 하동 농업협동조합에서 구입하였다. 포도과즙(White Grape conc. Comax international corp., clear 68°Bx), 배과즙(한미 향료화학(주), clear 69°Bx)도 사용하였다. 이들 생약재의 추출은 배초향과 마찬가지로 가용성 고형분양을 기준으로한 추출수율을 고려하여 100℃에서 시간은 15~40분간 열수추출 하였다. 즉, 생약재에 10배의 물을 넣은 후 100℃에서 5분 간격으로 추출물을 채취하여 굴절당도계(N-1E, ATAGO, Brix 0~32%)로 고형분량을 측정하면서 추출되는 가용성 고형분량이 더 이상 증가하지 않을때까지 추출하였다. 이를 4℃에서 24시간 동안 방치하고 10,000 x g에서 10분간 원심 분리 한 후 상등액을 취하였다. 시간에 따라 추출되어 나오는 고형분량의 변화는 Fig. 20과 같으며 최적의 추출 평형시간은 모과는 15분, 당귀는 25분, 건강은 20분, 오미자는 40분, 배초향은 15분이었고 계피는 40분까지 추출하여도 추출되는 고형분량의 변화가 거의 없어서 약 30분을 최적의 추출 평형시간으로 하였다. 위와 같은 추출 평형시간으로 추출된 가용성 고형분량은 모과추출물 2.0°Bx, 당귀추출물 1.5°Bx, 건강추출물 1.0°Bx, 오미자 추출물 1.0°Bx, 배초향 추출물 0.4°Bx, 계피 추출물 0.1°Bx 이었다.

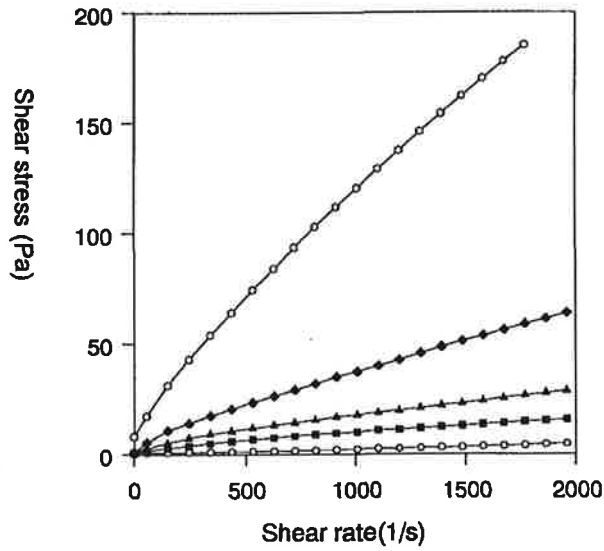


Figure 19. Shear stress vs shear rate plot for *A. rugosa* extract at 25°C.

○ : extracts ■ : 35 Bx ▲ : 45 Bx
 ◆ : 55 Bx □ : 65 Bx

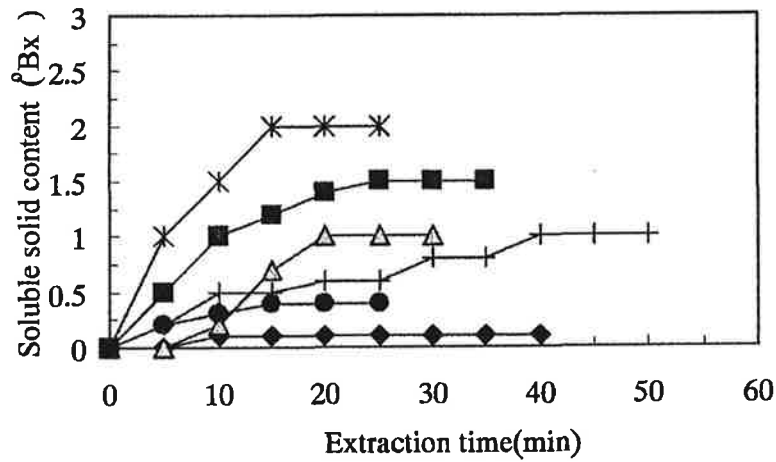


Figure 20. Soluble solid contents of various medicinal herbs by extraction time.

◆ 계피 ■ 당귀 ▲ 건강 + 오미자
 * 모과 ● 배초향

3-2-4. 당 및 산비 결정

가. 산미료 선정

생약재 추출물의 음료 제조시 pH4.0 이하에서는 저장 중 포자 형성균들의 발아가 억제되므로 미생물로 인한 품질 변화는 발생하지 않는다. 따라서 음료 제조시 산미료를 첨가하여 pH를 4.0 이하로 조절하는 것은 음료로서의 상큼한 맛을 증진시키면서 저온 저장성을 높이는 것이 주요 목적이다.

배초향 음료 제조를 위한 산의 첨가물은 여러 가지 산미료를 대상으로 시험한 결과 구연산과 비타민 C가 가장 적합한 맛을 내는 것으로 나타났다. 생약재 추출액 100ml 당 구연산 0.02g, 0.04g, 0.06g, 0.08g, 0.12g, 0.16g을 첨가하여 관능검사를 실시한 결과 0.08g 이상에서는 신맛이 강하게 감지되었으며 0.02g 첨가구에서는 신맛이 매우 약하였다. 또한 구연산만을 사용한 처리구는 맛에 대한 기호도가 낮은 결과를 나타내었다. 따라서 배초향 음료제조를 위한 당·산비의 결정시험에서 산의 첨가량은 구연산 0.06g, 비타민 C 0.08g으로 결정하였다. 이때 비타민 C는 구연산의 신맛을 상큼하게 보완하는 효과와 비타민 보충효과의 2가지 목적에서 첨가하였다.

나. 당류 선정

배초향 음료 제조를 위한 당류의 첨가물은 포도당, 고과당, 스테비오사이드 및 설탕등의 당류중에서 예비실험 결과 용해성, 관능평가 및 경제성 등을 고려하여 고과당으로 결정하였으나 여기에 설탕을 첨가하는 것이 고과당만을 처리한 것보다 좋은 기호도를 나타내었다. 생약재 추출액 100ml 당 고과당과 설탕을 각각 2g, 4g, 6g, 8g 첨가하여 관능검사를 실시한 결과, 고과당 4g 이하 첨가구는 배초향 음료의 당/산비가 맞지 않아 맛이 밋밋하며 싱겁다는 관능평가를 나타내었고 8g 첨가구는 단맛이 강하게 감지되었으며, 설탕 6g, 고과당 7g 첨가시 당/산비의 적당한 배합으로 가장 높은 관능평가를 나타내었다. 따라서 배초향 음료의 당 첨가량은 배초향 및 생약재 추출액 100ml 에 대하여 고과당 7g, 설탕 6g 첨가량으로 결정하였다.

3-2-5. 당, 산의 첨가에 따른 추출물의 관능평가

배초향, 박하, 계지를 원료로한 추출물에 대해서 당과 산을 첨가하여 관능 검사한 결과는 Table 23과 같다. 산미료는 pH 4.0을 기준으로 하여 고정시킨 상태에서 당은 설탕과 고과당을 혼합하면서 9점 척도법에 의해 관능검사를 실시하였다. 설탕과 고과당을 따로 첨가한 배합비보다 혼합하여 첨가한 배합비가 더 좋은 기호도를 나타내었다. 특히 (C) 배합비는 색, 맛, 종합적인 기호도에 있어서 가장 좋은 기호도를 보였다.

3-2-6. 음료제조를 위한 생약재 추출물의 배합비

10종의 생약재 추출물에 대한 관능적 특성은 매실추출물은 매실 특유의 상큼한 맛과 신맛이 강하게 나타났으며, 건강 추출물은 생강 특유의 아린 맛이 있었다. 계피추출물은 특소는 맛과 개운한 맛이 향과 함께 강하게 나타났으며, 오미자 추출물은 약간의 추출로도 강한 신맛을 느낄 수 있었고 당귀추출물은 은은한 한약재 향과 짙은 뒷맛이 느껴졌다. 모과추출물 또한 시원한 과일향과 맛을 나타내었다.

Table 23. Sensory evaluation of organistic characteristics of extracts by adding sugars and acids

검사항목	시료			
	A ¹⁾	B ²⁾	C ³⁾	D ⁴⁾
색	6.5 ^{b)}	6.3	6.7	6.9
맛	6.3	5.9	7.2	5.9
종합적인 기호도	6.2	6.0	7.0	6.0

1) : 구연산(0.06%) vit C(0.08%) + 설탕(13%)

2) : 구연산(0.06%) vit C(0.08%) + 고과당(13%)

3) : 구연산(0.06%) vit C(0.08%) + 설탕(6%) 고과당(7%)

4) : 구연산(0.06%) vit C(0.08%) + 설탕(4%) 고과당(7%)

5) : 1점: 아주 나쁘다, 3점 : 나쁘다, 5점 : 보통이다, 7점: 좋다, 9점: 아주 좋다.

드링크 타입의 배초향 음료 제조에 있어서 적정배합비 선정을 위한 각 생약재 추출물의 배합을 시도한 결과는 다음과 같다. 배초향 추출물은 꽃, 잎, 줄기의 혼합물에 대하여 25배의 물을 첨가하여 100℃에서 15분간 추출한 추출물이고, 각각의 생약재는 10배의 물을 첨가하여 100℃에서 10~40분간 추출한 추출물을 사용하였다. 매실추출물은 69°Bx짜리 매실농축물을 10°Bx로 희석한 액을 사용하였으며, 포도과즙(White Grape, 65°Bx)과 배과즙(69°Bx)은 원액을 사용하였다. 설탕은 배합비에 따라 음료제조후 총가용성 고형분량이 13°Bx가 되도록 첨가하였고 pH는 저장성을 고려하여 4.0미만으로 조절하고자 하였다. 이때 추출하여 사용한 생약재의 가용성 고형분함량은 배초향 추출물 0.4°Bx, 건강추출물 1.0°Bx, 당귀추출물 1.5°Bx, 모과추출물 2.0°Bx, 오미자추출물 1.0°Bx, 계피추출물 0.1°Bx 이었다. 아래의 각 배합비들은 10명으로 구성된 panel discussion 방식에 의해 관능평가를 실시하였다.

가) 배합비 1

원.부재료	배초향 추출물	매실추출물	건강추출물	포도과즙	설탕
mL	10	1.0	0.5	10	1.79(g)

배초향의 맛과 향은 적당히 은은함을 느낄 수 있었으나 매실맛이 좀 강하게 느껴졌다. 건강추출물과 포도과즙의 양을 좀 늘리고 매실추출물의 첨가량을 줄여서 다음 배합비 실험을 실시하였다.

나) 배합비 2

원.부재료	배초향 추출물	매실추출물	건강추출물	포도과즙	설탕
mL	10	0.5	0.7	0.7	1.76(g)

배합비 2는 산도나 맛에 있어서 적당하고 배초향의 박하향도 좋았다. 하지만 배초향의 풀냄새가 좀 나므로 이것을 masking하기 위해서 당귀추출물을 첨

가해 보기로 하였다.

다) 배합비 3

원. 부재료	배초향 추출물	매실추출물	건강추출 물	포도과즙	당귀추출 물	설탕
mL	10	0.3	0.5	0.5	0.5	1.79(g)

배합비 3은 배합비 2보다 배초향의 플냄새와 맛은 감소하였지만 포도맛이 너무 강하게 느껴져서 포도과즙의 양을 줄여보았다.

라) 배합비 4

원. 부재 료	배초향 추출물	매실추출물	건강추출물	포도과즙	당귀추출물	설탕
mL	10	0.3	0.5	0.1	0.7	1.73(g)

포도과즙의 양을 좀 줄이고 당귀추출물의 양을 늘려서 관능검사를 한 결과 배초향의 맛과 향은 적당한 것으로 판단되었으며 산도도 적당하였다. 포도맛도 적당하게 느껴졌다. 단, 당귀향이 좀 강하게 느껴졌다.

마) 배합비 5

원. 부재료	배초향 추출물	매실 추출물	건강추출물	당귀추출물	배과즙	설탕
mL	10	0.3	0.5	0.5	0.1	1.70(g)

배합비 5와 같이 당귀추출물의 양을 좀 줄이고 포도과즙대신 배과즙을 첨가한 결과 맛이 시원하게 개선되었다. 이때 음료의 pH는 3.70이었다.

바) 배합비 6

원. 부재료	배초향 추출물	오미자 추출물	건강추출물	당귀추출물	배과즙	설탕
mL	10	0.6	0.5	0.5	0.1	1.73(g)

배합비 5의 매실추출물 대신 오미자추출물을 첨가하여 보았다. 오미자추출물의 첨가량이 많아서 오미자 맛이 너무 강했고 pH도 4.5로 높아졌다. pH를 낮추기 위해서 오미자추출물을 더 넣으면 오미자 맛이 너무 강해져서 관능적 특성이 좋지 않은 것으로 평가되었다.

사) 배합비 7

원. 부재료	배초향 추출물	매실추출물	건강추출물	당귀추출물	모과추출물	설탕
mL	10	0.3	0.5	0.5	0.5	1.74(g)

적당한 맛과 색도, 투명도가 좋고 모과의 시원한 맛도 느껴졌다. 그러나 모과와 당귀추출물로 인하여 떫은 뒷맛이 혀에 많이 남았다.

아) 배합비 8

원. 부재료	배초향 추출물	매실추출물	건강추출물	당귀추출물	배과즙	계피추출물	설탕
mL	10	0.3	0.5	0.3	0.1	0.2	1.70(g)

모과추출물을 제외시키고 당귀추출물의 양을 줄였다. 떫은맛이 많이 줄었고 맛, 색깔, 투명도 모두 좋았다. 하지만 계피맛이 좀 강하게 느껴졌다.

자) 배합비 9

원. 부재료	배초향 추출물	매실 추출물	건강추출물	당귀추출물	배과즙	계피추출물	설탕
mL	10	0.3	0.5	0.3	0.1	0.1	1.69(g)

계피추출물의 양을 좀 줄여서 배합비 9를 만들었다. 전체적으로 구성 성분들이 잘 어울려서 적당한 맛과 향을 나타내었다.

차) 배합비 10

생약재	배초향 추출물	매실 추출물	건강 추출물	당귀 추출물	계피 추출물	배과즙	설탕
mL	10	0.3	0.5	0.2	0.1	0.1	1.67(g)

배합비 9에서 느껴졌던 허에 남는 약간의 생약맛을 줄여 보고자 당귀추출물의 첨가량을 줄여 보았다. 생약맛은 약간 덜하나 전체적인 음료의 body감이 느껴지지 않았다. 따라서 배합비 중에서 가장 관능적 평가가 우수한 배합비 9를 대량 배합을 위한 배합비로 결정하고 대량 배합시험을 실시하였다. 이때 음료의 pH는 3.73이었다.

3-2-7. 대량 배합

배합비 9의 전체 양을 1000 g을 기준으로 음료배합을 실시하였다. 이때 들어간 각 재료들의 양은 모든 추출물의 가용성 고형분량을 100°Bx 라고 가정했을 때 첨가되는 양으로 계산하였다. 예를 들어 배초향추출물이 50°Bx 짜리라면 $3.080 \text{ g} \times 2배 = 6.160 \text{ g}$ 이 첨가되어야 총고형분량은 3.080g이 함유되게 된다. 또한 대량배합시 설탕을 당류로 사용하면 용해도의 문제가 크므로 고과당으로 대체하였다. 이때 설탕 130.000 g에 해당하는 고과당(과당 55%이상, 고형분 78°Bx기준)의 양은 $130.000 \text{ g (설탕)} \times 100/78 = 166.666 \text{ g}$ 을 첨가하였다. 전체적으로 단맛도 상큼해졌고 배합공정이 크게 개선되었다. 전체의 양을 1

ton(1,000 Kg)으로 하게되면 아래의 배합비에 모두 1000배를 하여 배합하면 된다.

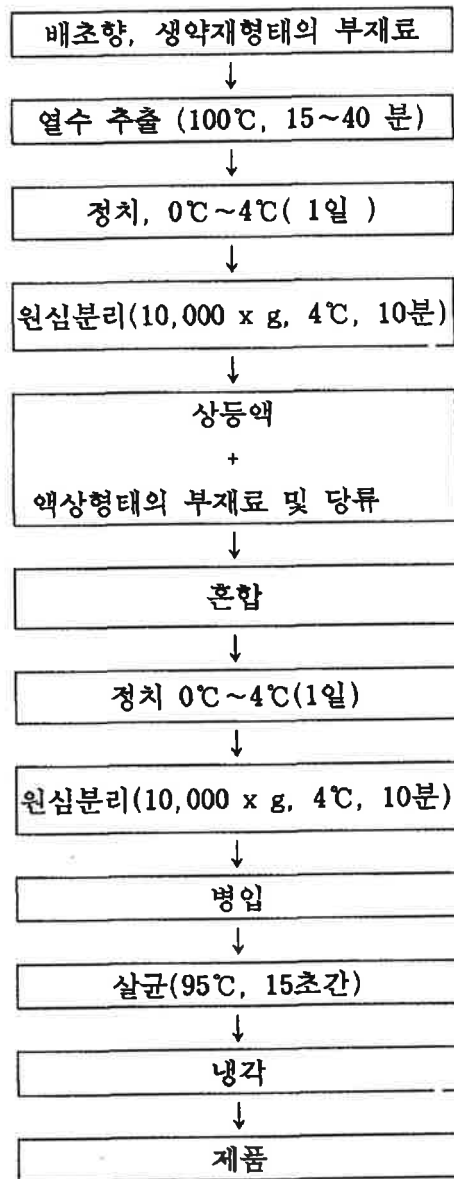
생약재	배초향 추출물	매실 추출물	건강 추출물	당귀 추출물	계피 추출물	배과즙	고과당	물	총량
g	3.080	2.310	0.380	0.350	0.008	5.310	166.66 6	821.89 6	1000 g

3-2-8. 배초향 음료의 침전물 형성방지 및 살균 처리

생약재 추출물을 0.2 μ m 카트리지 필터로 여과하여도 저온에서 일정시간동안 방치하게 되면 추출물 성분의 용해도가 변하게 되므로 침전물이 생성되는데 이를 제거하기 위하여 하루 동안 냉장상태로 정치한 후 원심분리하여 침전물을 제거시키고 상등액을 이용하였다. 또한 최종배합비로 제조한 배초향음료의 살균은 95℃에서 15초간 처리하였다. 최종배합비로 제조한 배초향 음료의 pH가 3.9 이하의 산성 상태이므로 위와 같은 살균 조건으로 처리하여도 음료내에 함유되어 있던 영양세포는 모두 사멸되고 저장중 포자형태의 미생물로 인한 품질 변화는 발생하지 않을 것으로 판단하였다. 한편, 포자형성균까지 멸균시키기 위해서 더 높은 온도에서 오랜시간동안 열처리를 하면 갈변이나 탄맛, 생리활성의 저하 등 음료제품의 품질이 매우 열화되므로 비효율적인 것으로 평가되었다.

3-2-9. 배초향 음료 최종 제조 공정도

배초향을 이용한 드링크 타입의 음료 제조 최종 공정은 scheme 6와 같다. 배초향과 생약재형태의 부재료들을 100℃의 온도에서 각각 시간을 달리해서 추출하여 24시간동안 4℃에서 방치한 후 10,000 x g로 10분간 원심분리 하였다. 그 후, 상등액을 회수하여 배합비 9와 같이 배합한 후 다시 24시간동안 0℃ ~



Scheme 6. Flowchart for making of *Agastache rugosa* beverage.

4℃에서 방치한 후 위와 같은 조건으로 다시 원심분리하였다. 배합된 음료를 병에 담아 살균시켜 냉각한 후 제품으로 하였다.

3-2-10. 배초향 음료의 저장중 품질특성

제조된 드링크 타입의 배초향음료는 4℃와 25℃에 180일간 저장하면서 20일 간격으로 시료를 채취하여 미생물, 색도, pH, 산도, 관능적 변화등의 5가지 항목을 계속 조사하였고 결과는 Table 24, 25와 같다.

가) 미생물

4℃와 25℃에 저장중인 배초향 제조음료를 10~10³배로 희석하고 이를 시료로 하여 미생물중 대장균, 대장균군, 호기성 세균, 효모, 곰팡이에 대해서 각각의 petrifilm (Microbiology Products 3M Health Care, Petrifilm™)에 접종하여 2~3일간 37℃ incubator에서 방치후 미생물의 여부 및 총 생균수를 조사하였다.

나) 색도

4℃와 25℃에서 저장중인 음료에 대하여 색차계 (Color difference meter, color Quest II HunterLab, USA)를 사용하여 명도 (L, lightness), 적색도 (a, redness), 황색도 (b, yellowness)를 측정하고 색의 변화를 조사하였다. 이때 사용된 표준백색판의 명도, 적색도, 황색도는 각각 92.68, 0.81, 0.86이었다.

다) pH 및 적정산도

pH meter (pH/ION Meter DP-880, 동우메디칼 시스템(주))로 4℃와 25℃에서 저장중인 음료의 pH를 각각 측정하고 적정산도는 시료 25 mL을 취하여 0.1N NaOH로 pH가 8.4가 될 때까지 적정하여 소비량을 citric acid (mg)로 환산하였다.

$$\text{적정산도(\%)} = \frac{0.1N \text{ NaOH 소비량(mL)} \times \text{factor} \times 6.4(\text{mg})}{\text{시료채취량(mL)}} \times 100$$

라) 관능 검사

훈련된 관능요원들을 대상으로 저장중 음료에 대해 이미, 이취등의 변화를 비교 평가하였다.

Table 24, 25에서 보듯이 미생물의 경우 곰팡이, 효모, 대장균 및 박테리아 모두 25℃에서도 저장기간 180일까지도 검출되지 않아 음료의 안전성에서는 별 문제가 없는 것으로 평가되었다. 또한 pH도 3.74~3.86을 계속 유지했고 색도는 4℃, 25℃모두 Table 1, 2에서와 같이 명도(L), 적색도(a), 황색도(b)가 저장 기간이 지남에 따라 조금 감소하였다. 특히, 25℃에서 저장한 시료의 경우 육안으로 약간의 갈변이 진행됨을 확인할 수 있었지만 큰 차이는 없었다. pH, 산도, 관능적 특성에 있어서는 180일까지도 별다른 차이가 없는 것으로 나타났다. 25℃ 저장구의 경우에도 문제가 없는 것으로 볼 때 4℃저장의 경우에는 더욱 문제가 없는 것으로 판단되었다.

Table 24. Change of physicochemical properties of *Agastache rugosa* beverage during storage at 25℃

검사항목	저장기간(일)									
	20	40	60	80	100	120	140	160	180	
미생물 (CFU/ml)	대장균	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-	-	-
	대장균군	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	호기성	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	세균	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	곰팡이	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	효모	-	-	-	-	-	-	-	-	-
색도	L	50.25	43.92	43.18	42.15	42.13	41.39	40.53	39.80	39.17
	a	15.74	15.78	16.05	15.29	14.80	14.35	13.57	13.30	12.16
	b	30.02	26.54	26.03	26.70	26.25	25.90	24.70	23.85	22.62
pH	3.86	3.74	3.74	3.75	3.80	3.75	3.75	3.80	3.80	
산도(%)	0.215	0.217	0.275	0.220	0.215	0.220	0.230	0.215	0.215	
관능적 특성	* ²⁾	*	*	*	*	*	*	*	*	

1) not detected

2) 변화없음

Table 25. Change of physicochemical properties of *Agastache rugosa* beverage during storage at 4°C

검사항목	저장기간(일)									
	20	40	60	80	100	120	140	160	180	
대장균	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	
대장균군	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
미생물 (CFU/ ml)	호기성	-	-	-	-	-	-	-	-	
	세균	-	-	-	-	-	-	-	-	
	곰팡이	-	-	-	-	-	-	-	-	
	효모	-	-	-	-	-	-	-	-	
색도	L	49.49	50.05	48.57	47.90	46.70	45.53	43.87	41.95	40.28
	a	15.95	16.06	16.82	16.30	15.82	14.86	14.50	13.67	13.38
	b	28.61	29.87	31.45	28.68	27.51	26.58	25.62	24.33	23.97
pH	3.85	3.74	3.80	3.75	3.80	3.76	3.84	3.79	3.80	
산도(%)	0.209	0.217	0.275	0.220	0.225	0.215	0.210	0.215	0.220	
관능적 특성	* ²⁾	*	*	*	*	*	*	*	*	

1) not detected

2) 변화없음

3-2-11. 배초향 탄산음료 제조

배초향 탄산음료의 가능성을 모색하기 위해 carbonation 처리를 해보았다. 배합비 9에 따라 최종 배합된 음료 4 L를 carbonation용기에 담아 5°C를 유지하면서 탄산가스 주입압력을 20psi, 30psi, 40psi로 조절하면서 탄산을 주입하여 맛을 본 결과 압력 30psi일 때 가장 맛이 적당한 것으로 나타났다. 따라서 용기내 압력 30psi, 온도 5°C의 조건으로 음료병 (350 ml)에 탄산과 함께 주입하여 밀봉하였다. 이를 다시 80°C에서 5분간 살균하여 제품으로 하였다. 관능검

사 결과 드링크 타입의 배초향 음료와는 달리 배초향 탄산음료는 탄산의 특소
는맛과 배초향의 박하맛이 잘 어우러지는 것으로 평가되었다.

3-3. 배초향 과립차 제조

3-3-1. 적정배합비 및 추출물의 물성 조절

위에서 선정한 배합비 9를 기준으로 설탕을 제외한 각각의 추출물들로 배합
하여 bagfilter로 1차 여과하고, cartridge filter로 2차 정밀 여과한 후, 5
5°C이하에서 65°Bx가 되도록 진공 농축하였다.

3-3-2. 과립화 조건 및 건조 조건 확립

65°Bx 의 배초향 혼합 농축물 15%와 함수결정 포도당 85%를 균일하게 혼합
하고, 과립성형기를 이용하여 15-20 mesh 크기로 과립을 제조하였다. 제조된
과립은 55°C 이하에서 수분함량 8% 이하로 열풍건조시켰다.

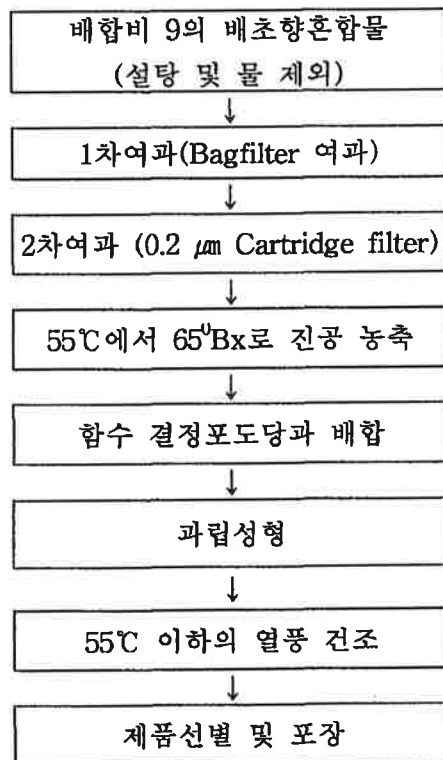
3-3-3. 과립차 대량 제조공정

배초향 음료 제조시 선정한 배합비로서 추출물을 제조하고 50°C이하에서 65
°Brix가 되도록 추출물의 물성을 조절한 후, 농축물 85%, 포도당 85%를 균일하
게 혼합하여 15-20 mesh의 과립을 제조하였으며 50°C 이하에서 수분함량 8% 내
외로 건조하여 과립차 제품 공정을 확립하였다. (Scheme. 7)

3-4. 배초향 잎을 이용한 엽차

3-4-1. 배초향 잎의 적정 볶음조건

6개의 볶음조건별로 관능검사를 실시한 결과 200℃, 30초의 볶음조건이 배초향 특유의 향과 색깔을 유지하면서 구수한 향도 적당히 가지고 있었다. 170℃, 1분의 볶음조건도 관능적으로 좋은 것으로 나타났으나 구수한 향이 좀 부족하고 풀 냄새가 다른 조건에 비해 강하게 나타났다. 200℃, 1분의 볶음조건은 30초의 볶음조건보다 구수한 향이 좀더 강하지만 배초향 특유의 향은 좀 약했다. 다른 조건들은 향과 색깔에서 바람직하지 않은 것으로 평가되었다. 따라서 배초향을 단독으로 사용하여 엽차를 제조할 때에는 배초향 특유의 향은 좋지만 약간 짝짤한 맛이 느껴지는 200℃, 30초의 조건보다는 구수한 향이 좀더 강한 200℃ 1분의 조건이 적당한 것으로 평가되었다.



Scheme 7. Flowchart for making of *Agastache rugosa* granule tea

현미와 등글레를 첨가할 혼합차용의 볶음조건으로는 구수한 맛과 향이 등글레와 현미에서 보충되는 것을 고려 할 때 구수한 맛과 향은 좀 약하지만 배초향의 고유한 맛과 향이 많이 남아있는 200℃, 30초의 조건이 좋은 것으로 평가되었다. 따라서 볶음조건이 200℃, 30초인 잎은 배초향 혼합차에 사용하고, 200℃, 1분인 잎은 배초향 단독엽차에 사용할 배초향 잎의 원료로서 결정하였다. 이에 대한 관능검사 결과는 table 26과 같다.

3-4-2. 배초향 엽차의 적정 음용법 시험

배초향 엽차를 비롯한 모든 차의 맛과 향은 첨가되는 잎의 양과 물의 추출 온도, 추출 시간에 따라 많이 다르다. 본 시험에서는 배초향잎의 첨가량, 추출 시간, 추출 온도를 달리하여 박히향, 구수한 맛, 짹짹한 맛, 갈색도에 대하여 관능적 특성을 관찰하였다. 배초향의 고유한 향과 구수한 맛은 유지되고 배초향의 좋지 않은 관능적 특성인 짹짹한 맛은 최대한 약하게 나타내면서 적당한 갈색도를 유지할수 있는 적정 음용법을 시험하였다.

Table 26. 배초향 잎의 볶음조건에 따른 관능검사

평가 항목	볶음 조건					
	170℃			200℃		
	1분	3분	5분	30초	1분	2분
박히향	3*	2	1	3	2	1
구수한 향	3	4	4	4	5	2
풀 냄새	4	2	1	3	2	2
탄 냄새	2	3	4	2	3	5
매운 냄새	2	3	5	2	3	5
색깔	연녹색	엷은 갈색	갈색	연녹색	엷은 갈색	검은 갈색

* 5: 매우 강하다, 4: 강하다, 3: 보통이다, 2: 약하다, 1: 매우 약하다

가) 배초향 잎의 첨가량 결정

배초향 엽차 제조에 첨가될 잎의 적정량 결정은 80℃의 물 100 mL에 2분 동안 추출하는 것을 기준으로 하였다. 200℃에서 1분간 볶은 배초향잎을 0.2 g, 0.3 g, 0.4 g 첨가하여 맛과 향에 대한 기호도를 panel discussion에 의한 관능검사 방법으로 평가하였다. 색도는 색차계(Color difference meter, Color Quest II HunterLab, USA)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)를 측정하고 색의 변화를 조사하였다. 이때 사용된 표준백색판의 명도, 적색도, 황색도는 각각 92.68, 0.81, 0.86이었다. 그리고 투과도는 추출액을 10배 희석하여 280 nm에서 투과도(Transmittance)를 측정하여 추출액의 빛에 대한 투과정도 (추출액의 탁도나 색의 진한 정도)를 관능평가 결과와 비교하였다. 그 결과, 배초향 잎의 첨가량이 증가할수록 명도는 조금씩 감소하고 황색도는 약간씩 증가하였으며, 투과도 또한 배초향 잎의 첨가량이 증가할수록 감소하여 색이 진해지는 것을 알 수 있었다 (Figure 21). 한편 배초향 잎의 양을 0.2 g, 0.3 g, 0.4 g을 첨가하여 관능평가한 결과는 Table 27과 같다. 0.2g 첨가시에는 짝짙한 맛, 박하향이 동시에 강하게 느껴졌고 구수한 맛과 색깔은 다른 처리구에 비해 약하였으며, 0.4 g 처리구는 짝짙한 맛이 많이 줄어든 반면 박하향도 함께 줄었다. 또한 색깔은 너무 강한 갈색을 나타내어 기호도가 떨어졌다.

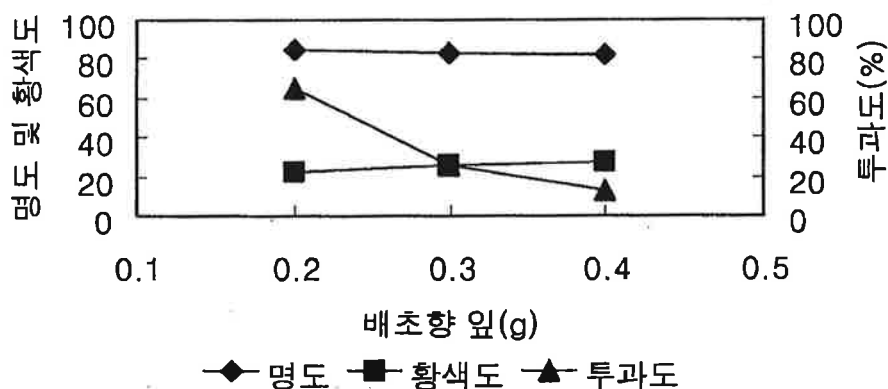


Figure 21. Transmittance and color change by contents of *A. rugosa* leaf.

0.3 g 처리구는 구수한 맛과 박하향도 적당히 강하고, 씹질한 맛이 많이 줄어들었다. 색깔 또한 적당히 강한 갈색을 나타내어 기호도가 세처리구 중 가장 좋은 것으로 나타났다. 따라서 최종적으로 배초향 엽차 음용시 80℃, 물100 mL에 적합한 배초향 잎의 양은 0.3 g으로 결정하였다.

Table 27. 배초향 잎 첨가량에 따른 배초향 엽차의 관능검사

평가 항목	배초향 잎의 첨가량		
	0.2 g	0.3 g	0.4 g
구수한 맛	2*	4	5
씹질한 맛	4	2	2
박하향	4	4	3
갈색도	3	4	5

* 5점: 매우 강하다 4점: 강하다, 3점: 보통이다. 2점: 약하다, 1점: 매우 약하다.

나) 추출 온도

200℃에서 1분간 볶은 배초향 잎 0.3 g을 온도가 각각 60℃, 70℃, 80℃, 90℃인 물100 mL에 넣고 2분간 추출한 후 5점척도법에 의한 방법으로 향과 맛에 대한 관능검사를 실시한 결과는 Table 28과 같다. 60℃의 경우 박하향은 강하게 나지만 구수한 맛과 볶음향이 약하고, 또한 약간 씹질한 맛과 이취를 나타내었다. 70℃의 경우 60℃보다는 구수한 향이나 볶음향이 좀 증가하였으나 박하향이 좀 줄었다. 80℃의 경우 구수한 맛과 볶음향이 강하였고 박하향은 60℃의 경우보다는 약하였다. 90℃의 경우에는 배초향 엽차라는 이미지와는 거리가 멀 정도로 구수한 맛과 볶음향이 강한 반면 박하향은 약하였다. 또한 색깔도 90℃ 추출 온도에서는 진한 갈색을 나타내었다. 따라서 배초향의 향을 어느정도 유지하면서 구수한 향과 맛을 느낄 수 있는 적당한 물의 추출 온도는 80℃로 결정하였다.

Table 28. 추출 온도에 따른 배초향 잎차의 관능검사

평가 항목	추출온도			
	60℃	70℃	80℃	90℃
구수한 맛	2*	3	4	5
박하향	4	3	3	2
볶음향	2	3	5	5

* 5점: 매우 강하다 4점: 강하다, 3점: 보통이다. 2점: 약하다, 1점: 매우 약하다.

다) 추출 시간

배초향 잎 0.3g을 80℃의 물 100 mL에 20, 40, 60, 90, 120, 150초까지 시간에 따라 추출한 추출액의 색도를 측정하고 L, a, b값을 비교한 후 향과 맛에 대한 관능평가를 실시한 결과는 Table 29와 같다. 추출 시간이 증가함에 따라 구수한 맛과 색깔의 강도가 증가하다가 40-60초 추출 시간 이후부터는 더 이상 크게 증가하지는 않았다. 박하향은 추출 시간이 증가할수록 점진적으로 감소하는 반면 색깔의 강도는 증가하였다. 추출 시간 40-60초 이후부터 120초까지는 배초향의 좋은 관능적 특성인 구수한 맛과 박하향 등이 더 이상 증가하지 않고 색깔 또한 적당히 강한 갈색을 유지하였다.

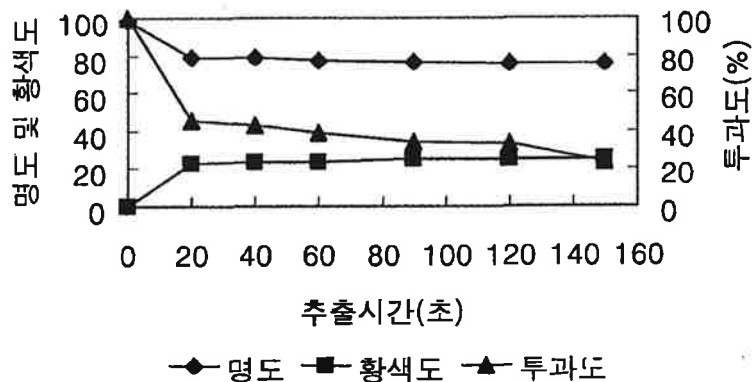


Figure 22. Transmittance and color change by extraction time of *A. rugosa* leaf.

추출 시간에 따른 색도 변화에서는 황색도와 명도 모두 40초 이상에서는 더 이상 큰 변화가 없었고 투과도도 40초까지는 크게 감소하다가 그 이후 완만하게 감소하여 40-60초 이상에서는 더 이상의 큰 증가가 없었다 (figure 22). 따라서 배초향 엽차의 최적 추출 시간은 60초(1분)로 결정하였다.

Table 29. 추출 시간별 배초향 엽차의 관능검사

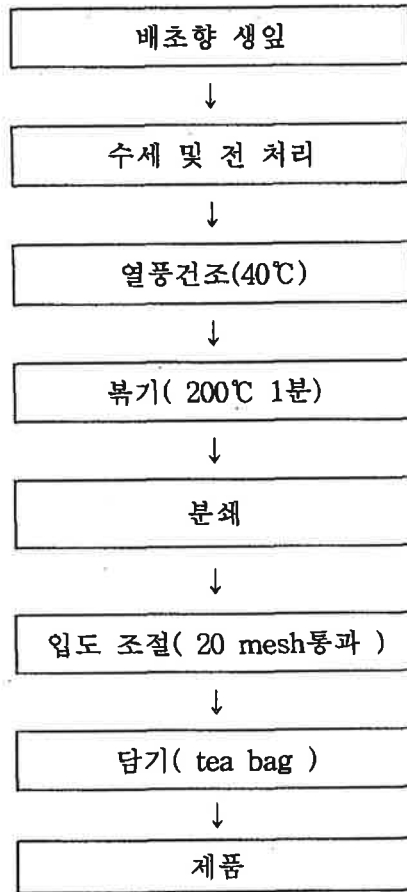
평가 항목	추출 시간					
	20초	40초	60초	90초	120초	150초
구수한 맛	2	2	3	4	5	5
짭짤한 맛	3	3	3	3	3	3
박하향	4	4	3	3	3	2
색깔	2	2	3	4	4	5

3-4-3. 배초향 엽차 제조공정도

배초향 잎만을 이용한 배초향 엽차 최종 제조공정은 scheme 8과 같다.

3-5. 부재료를 혼합한 배초향 혼합차의 제조

다른 부재료를 첨가함으로써 배초향을 이용한 차의 맛과 향을 더 좋게 하거나 배초향 자체의 좋지 않은 관능적인 특성을 masking시킬 수 있고 또한 다른 기호성도 기대할 수 있다. 본 연구에서는 현미, 황정 (등글레) 등을 첨가하여 시각적 기호도 및 관능검사 등 종합적 기호도 평가를 실시하여 각 재료의 최적 배합비율을 결정하고자 하였다.



Scheme 8. 배초향 엽차 제조공정도

3-5-1. 배초향 혼합차 제조시 배초향 잎의 적정 첨가량

앞에서 언급한 배초향 잎만을 사용한 배초향 엽차는 roaster에서 200℃, 1분 간 볶은 잎 0.3 g 넣는 것을 최적조건이라고 결정하였다. 배초향 혼합차에는 200℃, 30초간 볶은 배초향 잎을 사용하므로 적정한 잎의 첨가량을 새로이 시험하였다. 40℃에서 열풍건조한 배초향 잎을 0.3 g, 0.4 g, 0.5 g, 0.6 g수준으로 나누어 추출하여 나온 추출액을 10여명의 관능검사요원에 의한 panel

discussion 방법으로 맛과 향에 대해서 관능검사를 하였다. 이때 추출 조건은 앞에서 실험한 최적 조건인 80℃, 100 mL에 1분간 추출하였다. 이때 목표로 하는 관능평가 항목은 구수한 향과 배초향 특유의 화한 박하향을 주로 고려하였다.

Table 29. 배초향 잎 첨가량에 따른 관능검사

평가 항목	배초향 잎 첨가량			
	0.3 g	0.4 g	0.5 g	0.6 g
구수한 향	2*	3	4	4
박하향	3	4	5	5

* 5 : 매우 강하다, 4 : 강하다, 3 : 보통이다, 2 : 약하다, 1 : 매우 약하다.

0.3 g 첨가시에는 구수한 향과 박하향이 모두 약하였다. 0.4 g 첨가할 때는 박하향이 좀 강하게 느껴졌으며 구수한 향도 적당한 것으로 판단되었다. 0.5 g 첨가시에는 구수한 향과 배초향의 박하향이 모두 강하게 감지되었다. 0.6 g 첨가시에도 구수한 향과 박하향이 모두 강하게 느껴졌으나 뒤에 약간 짝 짝하고 역겨운 맛이 감지되었다. 이는 첨가하는 배초향의 양이 너무 많은 것으로 판단되었다. 따라서 0.4 g, 0.5 g 모두 적당한 것으로 평가되었지만 등굴레나 현미를 첨가하여 구수한 향이 보강되는 효과를 고려하면 배초향의 박하향이 좀 강한 0.5 g이 가장 잘 어울리는 것으로 평가되어 0.5g을 배초향 혼합차 제조시 배초향 잎의 최적 첨가량으로 결정하였다.

3-5-3. 등굴레와 현미의 첨가량

배초향의 구수한 향은 배초향 잎을 볶는 과정에서 일부 발현되는 것으로 강도는 그다지 크지 않다. 따라서 배초향으로는 배초향의 고유한 특유의 화한 박하향을 내고 구수한 향과 맛은 등굴레나 현미의 구수한 향으로 보완을 해주면 바람직한 배초향 혼합차가 될 것으로 평가되어 등굴레와 현미를 첨가해 보기로

하였다. 또한 등굴레 또는 현미를 단독으로 첨가하여도 구수한 향을 내는데는 문제가 없지만 배초향의 박하향과 잘 어우러지지 않는 점이 있었다. 즉 등굴레만을 첨가했을 경우 등굴레의 향이 너무 강하고 단순하다는 느낌이 들었고, 현미만 첨가했을 경우 어우러지는 은은한 맛과 향은 좋지만, 구수한 향이 너무 약하고 배초향의 박하향이 두드러져 향의 균형이 맞지 않는 것으로 평가되었다. 따라서 등굴레와 현미를 Table 30과 같은 배합비로 첨가하여 10여명의 관능검사요원에 의한 panel discussion 방법으로 최적 배합비를 결정하였다.

Table 30. 등굴레와 현미 첨가량에 따른 배초향 혼합차의 관능검사

평가 항목	배초향 잎(g) : 등굴레(g) : 현미의 첨가량(g)			
	배합비 1	배합비 2	배합비 3	배합비 4
	0.5 : 0.1 : 0.4	0.5 : 0.2 : 0.3	0.5 : 0.3 : 0.2	0.5 : 0.4 : 0.1
박하향	4*	4	4	4
구수한 향	2	3	4	4
종합적 기호도	2	4	5	3

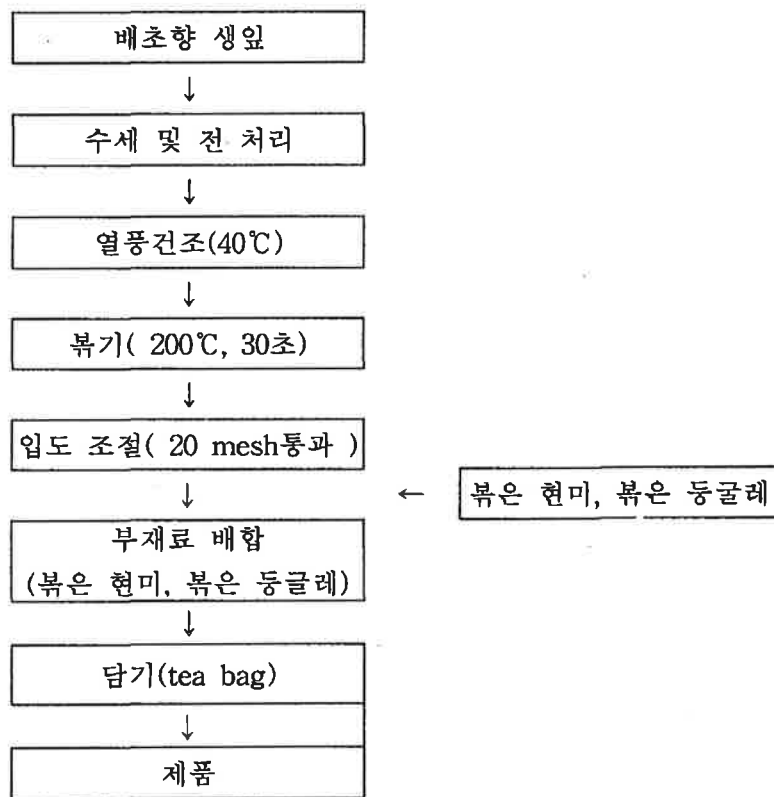
* 1점: 매우 약하다(매우 나쁘다), 2점: 약하다(나쁘다), 3점: 보통이다.

4점: 강하다(좋다), 5점: 매우 강하다(매우좋다)

배합비 1은 등굴레와 현미의 맛이 약하게 느껴지고 배초향의 박하향이 강하게 감지되었다. 배합비 2는 배초향의 향은 그대로이고 등굴레의 향이 좀 느껴졌다. 배합비 3은 등굴레의 구수한 향과 현미의 구수한 향, 배초향 특유의 향이 동시에 강하게 느껴졌다. 배합비 4는 현미의 구수한 맛은 거의 느껴지지 않고, 맛이 단순하면서 배초향의 향만 강하였다. 따라서 배초향을 이용한 혼합차 제조에는 배초향 잎 0.5 g, 등굴레 0.3 g, 현미 0.2 g이 들어가는 배합비 3이 가장 적당한 것으로 평가되었다. 적정 음용법은 80℃의물 100 mL에 1분간 우려내어 마시는 것이 가장 좋았다.

3-5-4. 배초향 혼합차 제조공정도

배초향 잎과 부재료를 이용한 배초향 혼합차의 최종 제조공정은 scheme 9와 같다.



Scheme 9. 배초향 혼합차 제조공정도

3-6. 배초향 추출물을 이용한 향신료

3-6-1. 배초향 추출 시험

배초향 추출은 색, 향, 맛 등의 관능적 특성을 비교해 보기 위하여 열수와 주정을 용매로 사용하여 추출물을 제조하였다. 배초향 잎에 25배의 70%주정 및 물을 넣고 80℃와 100℃에서 1~15분 동안 추출하여 냉각시키고, 12시간 동안 정지한 후 10,000 x g에서 원심 분리하여 상등액을 회수하였다. 이를 관능 요원으로 선발된 10여명의 panel discussion에 의한 방법으로 향과 맛에 대해서 관능 검사를 실시하였다.

가) 열수 추출

동결 건조한 잎과 40℃ 열풍 건조한 잎에 대하여 25배의 물을 넣고 80℃와 100℃에서 20분 동안 추출하면서 1, 3, 5, 7, 9, 11분의 순서로 추출물을 회수하여 10여명의 관능요원에 의한 panel discussion 방법으로 향과 맛에 대해서 관능 검사를 실시한 결과는 table 31과 같다. 동결 건조한 잎과 열풍 건조한 잎을 추출한 결과 100℃보다는 80℃ 열수 추출물이 기호도에 부정적인 영향을 미치는 배초향의 짝짤한 맛과 냄새는 약하고, 박하향 등의 좋게 느껴지는 관능적 특성이 더 우수한 것으로 나타났다. 또한 열풍 건조한 잎은 동결 건조한 잎보다 같은 온도에서도 짝짤한 맛과 냄새가 더 강하였고, 가열 취가 동결 건조 잎보다 강하였다. 따라서 열수 추출 할 때 원료는 열풍 건조한 잎보다는 동결 건조한 잎을 사용하는 것이 좋은 것으로 평가되었다. 추출 시간에 대해서는 7분까지는 향과 맛이 증가하나 그 이상에서는 추출 시간이 증가하여도 박하향 등의 향은 더 이상 증가하지 않고 짝짤한 맛과 냄새 등의 좋지 않은 특성이 계속 증가하였기 때문에 온도 80℃에서 7분 동안 열수 추출하는 것이 가장 바람직한 것으로 평가되었다.

나) 주정 추출

열수 추출과 같은 방법으로 주정(70%, 50%)을 용매로 하여 80℃의 온도에서 시간별로 추출하고 관능 검사를 실시한 결과는 table 32와 같다. 70%와 50% 주정으로 동결 건조한 잎과 열풍 건조한 잎을 대상으로 추출한 추출물을 비교한

결과 색깔에서 차이를 보였다. 70%주정으로 추출할 때에는 선명한 초록색을 나타냈고 50%주정으로 추출했을 때는 약간의 갈색이 가미된 어두운 초록색을 나타내었다. 이는 70%로 추출했을 때 엽록소 등의 색소와 정유 성분들이 많이 추출되어 나오기 때문인 것으로 생각된다. 향과 맛에 있어서도 70%로 추출했을 때가 50% 추출했을 때보다 부정적인 짝짤한 맛과 향은 적고, 박하 향은 더 강한 것으로 나타났다. 추출 시간은 열수와 같이 7분 정도가 관능적 특성을 고려할 때 가장 적당한 것으로 평가되었다. 뿐만 아니라 동결 건조한 잎을 추출한 것이 향이나 맛에 있어서도 더 우수한 것으로 평가되었다. 따라서 주정으로 추출 시 70%주정으로 80℃에서 7분간 추출하는 것이 최적으로 평가되었다.

Table 31. 열수 추출물의 관능검사

평가 항목	동결 건조한 잎		열풍 건조한 잎	
	80℃	100℃	80℃	100℃
짝짤한 맛과 냄새	3*	5	4	5
박하향	4	3	3	2
가열취	3	5	4	5
색깔	밝은 갈색	어두운 갈색	갈색	어두운 갈색

* 5점: 매우 강하다, 4점: 강하다, 3점: 보통이다, 2점: 약하다, 1점: 매우 약하다.

Table 32. 주정 추출물의 관능검사

평가 항목	동결 건조한 잎		열풍 건조한 잎	
	70% 주정	50% 주정	70% 주정	50% 주정
짝짤한 맛과 냄새	2*	4	3	4
박하향	5	4	4	3
가열취	1	1	1	1
색깔	초록색	어두운 초록색	초록색	어두운 초록색

* 5점: 매우 강하다, 4점: 강하다, 3점: 보통이다, 2점: 약하다, 1점: 매우 약하다

위의 추출 방법들에 대한 종합적인 고찰과 결론은 다음과 같다. 열수 추출은 주정(70%)추출에 비해서 박하향이 상대적으로 적고, 또한 주정 추출물에서는 나타나지 않는 향료로서의 바람직하지 않은 풀 냄새나 짝퉁한 냄새가 많이 느껴져서 배초향을 이용한 미립형 향신료의 추출물 소재로는 적합하지 않은 것으로 평가되었다. 이와 반대로 주정(50%, 70%)으로 추출할 경우 배초향 특유의 박하향이 강하게 살아나며 풀 냄새 등은 거의 느껴지지 않았다. 50% 주정 추출물인 경우 70%주정 추출물보다 박하향이나 상큼한 향 등도 부족하고 약간의 풀 냄새같은 좋지 않은 향과 맛이 느껴지기 때문에 배초향을 이용한 미립형 향신료의 원료 소재로는 동결 건조한 배초향 잎에 대하여 25배의 70%주정을 넣고, 80℃에서 7분간 추출한 70% 주정 추출물을 사용하기로 결정하였다.

3-6-2. 배초향을 이용한 미립형 향신료 배합

우선 레몬향이 첨가된 것과 첨가되지 않은 것을 구분하여 다음 6가지(A-F)의 배합을 제조하였다. 이에 대한 배합비는 table 33과 같다. 이때 주정과 정제 증류수의 배합비는 항상 7:3이 되도록 첨가하여 배초향 70% 주정 추출물과 잘 혼합되도록 하였다. 이와 같이, 배초향을 이용한 미립형 향신료에 대한 1차 배합을 실시하고 관능 검사를 한 결과, 배합비 E와 F는 박하향이 강해서 상큼하게 느껴지지만 박하맛도 강하게 남아서 음식에 첨가했을 경우 맛과 향이 음식에 많이 남게 되어 잘 어울리지 않는 것으로 평가되었고, 배합비 A와 B는 약간의 화장품 냄새가 나서 음식에 부적절한 것으로 평가되었다. 배합비 C는 약간 가열취가 나지만 배초향의 고유한 맛이 느껴지며, 배합비 D는 레몬향이 첨가되어서 가열취가 masking되고 배초향의 고유한 박하향과 맛도 느껴져 가장 적당한 것으로 평가되었다. Natural oil (B-13791)을 사용한 배합비 E와 F, 화장품 냄새가 나는 배합비 A와 B, 가열취가 느껴지는 배합비 C를 제외시키고, natural oil (B-13790)과 레몬향을 사용한 배합비 D를 배초향을 이용한 미립형 향신료의 최적 배합비로 결정하였으며, 이 배합비 D를 기본으로 하여 용도별 미립형 향신료를 제조하였다.

Table 33. 배초향을 이용한 미림형 향신료 배합비

배합 원료	배합비					
	A	B	C	D	E	F
Natural oil	B-13789	10 mL	10 mL			
	B-13790			10 mL	10 mL	
	B-13791					10 mL 10 mL
레몬향		50 mL		50 mL		50 mL
배초향 70%주정 추출물	50 mL	50 mL	30 mL	30 mL	50 mL	50 mL
주정	658 mL	623 mL	672 mL	637 mL	658 mL	623 mL
정제 증류수	282 mL	267 mL	288 mL	273 mL	282 mL	267 mL
Total	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL

3-6-3. 용도별 미림형 향신료 배합

배초향을 이용한 미림형 향신료는 배초향 추출물 고유의 향과 상큼한 레몬향 등의 특성상 생선회나 구이용으로 사용한다면 생선의 비린내나 잡냄새를 탈취하고 masking 하면서 회 맛이나 생선구이의 맛을 돋구어 주는 것으로 예비 실험되었기 때문에 미림형 향신료의 용도를 회용과 구이용의 2가지로 나누어 배합하였다. 앞서 결정한 배합비 D는 레몬향과 natural oil 향 및 배초향 추출물 고유의 향과 맛이 회에 은은하게 남도록 하고, 기호에 따라 묽은 농도로 여러 번 뿌려 먹을 수 있도록 하는 회용으로 사용하는 것이 적당한 것으로 평가되었다. 구이용은 회보다는 비린내와 잡냄새가 강하고 불로 굽기 때문에 레몬향과 Natural oil 이 강한 열과 함께 휘발될 때 비린내나 잡냄새들도 같이 제거시키는 반면, 배초향 추출물의 고유한 향과 맛은 구이에 남아 있게 된다. 이러한 배초향 추출물의 향과 맛이 생선구이 자체의 구운 향과 맛에 어우러져 오히려 맛이 상승되는 것으로 평가되었다. 따라서 레몬향과 배초향 추출물 함량

을 증가시켜서 구이용 배합비 D-1을 제조하였다. 이렇게 만든 배합비 D 와 D-1 을 각각 회와 생선구이를 대상으로 10여명의 관능검사요원에 의한 panel discussion 방법으로 향과 맛에 대해서 관능 검사를 실시하였다. 회는 횃집에 서 구입하여 바로 향신료를 2-3회정도 뿌려 맛과 향을 보았으며 생선구이는 삼 치를 가스 오븐에 넣어 굽기전 미리 1-2회 정도 향신료를 뿌리고 굽는 중간에 도 1-2회 정도 뿌려 적당히 구운 후 1-2회 정도 더 뿌려 주면서 관능적 특성을 관찰하였다 (Table 34).

Table 34. 회용 및 구이용 배초향 미림형 향신료 대량 배합

용도	재 료					
	natural oil (B-13790)	레몬향 (B-13792)	배초향 추출물 (70%주정)	주정(95%)	정제 증류수	총량
D(회용)	2 mL	10 mL	6 mL	127.4 mL	54.6 mL	200 mL
D-1(구이용)	2 mL	12 mL	8 mL	124.6 mL	53.4 mL	200 mL

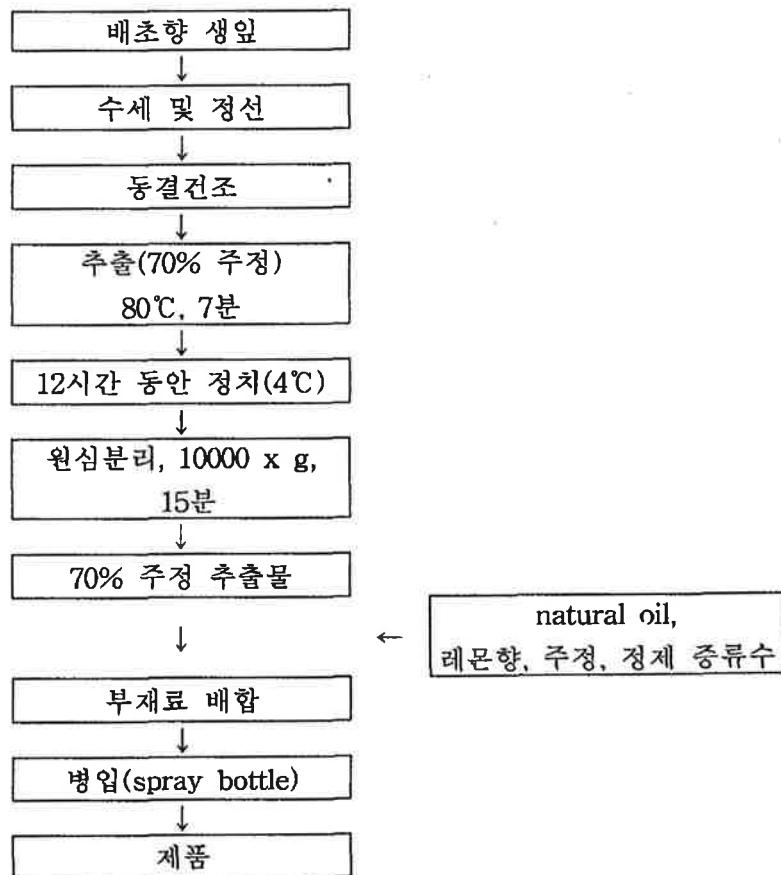
배합비 D를 회에 뿌리면 레몬향과 박하향이 적당히 느껴지면서 향긋하고 좋 았으며, 배합비 D-1은 생선구이(삼치구이) 에 3-4회 뿌리면서 맛을 보니 비린 내가 많이 제거되고 배초향의 고유한 맛과 향이 나서 좋다고 평가되었다. 따라 서 상대적으로 배초향 추출물이 적게 들어간 배합비 D는 비린내나 잡냄새가 비 교적 적은 회 등에 회 고유의 향과 맛을 살리면서 약간의 비린내와 잡냄새를 제거시켜줄수 있는 용도로 사용하는 것이 바람직할 것으로 생각되며, 배합비 D-1은 비린내나 잡내가 좀더 강한 생선 구이 등에 강한 비린내를 없애 주고 약 간의 배초향 맛과 향을 낼 수 있는 용도로 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된 다. 조리 시험 결과 기호에 따라 생선구이에도 2-6회정도 뿌려서 먹는 것이 적 당한 것으로 관찰되었다.

3-6-4. 배초향 미림형 향신료의 포장

배합비 D 와 D-1에 따라 제조한 향신료를 담아서 사용할 용기는 향신료 액을 분무하여 뿌려 먹을 시 기호에 따라 원하는 양만큼 뿌려 먹을 수 있고 저장과 사용상의 편의를 고려해 볼 때 spray bottle이 가장 적당한 것으로 평가되었다.

3-6-5. 배초향 미림형 향신료 제조공정도

배초향을 이용한 미림형 향신료 제품의 최종 제조공정은 scheme 10과 같다.



Scheme 10. 배초향 미림형 향신료의 제조공정도

3-7. 배초향 전초를 이용한 후리가게

3-7-1. 배초향 후리가게 base 제조시 최적 침지시간

40℃에서 열풍건조한 배초향 잎의 고유한 푸른색을 고정시키고 효소는 불활성화시키기 위해서 80℃의 2% 염수에서 1분 30초간 데친 후 냉수에 급냉각 시켜 자연 탈수시켰다. 이렇게 데친 배초향 잎 100 g을 위의 임시 조미액에 상온에서 3, 6, 9, 12, 24시간 동안 침지시킨 후 침지액을 따라 버리고 침지된 배초향 잎을 60℃에서 수분함량 10%내외로 열풍건조시켜 침지시간 별로 맛, 향, 색도에 대해서 10여명의 관능검사요원들에 의한 panel discussion 방법으로 평가하여 최적 침지 시간을 결정하였다. 이때 3, 6시간 동안 침지한 것은 조미액이 배초향 잎에 충분히 침투하지 않아 맛이 싱겁고 후리가게로서 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 또한 12시간 이상 침지하여도 짠맛의 강도나 향, 색의 변화가 더 이상 일어나지 않아서 12시간 정도면 충분한 침지라고 판단되었다. 따라서 최적 침지시간은 상온, 12시간으로 결정하였다.

<최적 침지시간 결정용 임시 조미액 배합비>

원, 부재료	소금	glutamate	함수 결정 포도당	솔비톨	물
g	30.0	2.3	9.5	9.0	170.0

3-7-2. 배초향 후리가게 base 제조용 최적조미액 배합비 결정

최종적으로 배초향 후리가게는 배초향만으로 제조된 배초향 후리가게 base 에다가 김, 마늘, 고춧가루, 파 등의 향신료가 더 첨가되어 제조된다. 따라서 본 시험에서는 배초향 후리가게의 가장 중요한 성분인 배초향 후리가게 base의 제조에 관하여 먼저 시험하였다.

소금, glutamate, 설탕 첨가량을 달리하여 성분별 최적 배합비를 결정한 후

다시 설탕, 함수 결정 포도당, 솔비톨 등의 당류들을 가지고 당의 종류에 따른 최종 배합비를 결정하였다. 즉 소금은 8%, 10%, 12%수준으로, glutamate는 0.1%, 0.3%, 0.5%수준으로, 설탕은 4%, 6%, 8%수준으로 첨가량을 달리 하였으며 당의 종류에 대한 결정 시험은 솔비톨, 함수 결정 포도당, 설탕을 단독 또는 혼합으로 첨가하여 시험하였다. 아래와 같이 다양한 배합비를 갖는 조미액 100 g에 대하여 80℃, 2%염수에 1분 30초간 데쳐서 자연 탈수시킨 배초향 잎 100 g을 넣고, 상온에서 12시간 침지후 건져내어 60℃에서 수분 함량을 6.0%내외로 건조시켜 배초향 후리가게 base를 제조하였다. 10여명의 관능검사요원들에 의한 panel discussion방법으로 짠맛, 단맛, glutamate맛을 세부항목으로 하는 맛과 향 그리고 색도를 평가하여 최적 배합비를 결정하였다. 색도는 색차계(Chromameter CR-300, Minolta Camera Co., Japan)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)를 측정하고 각 배합비 마다 색의 변화를 조사하였다. 이때 사용된 표준백색판의 명도, 적색도, 황색도는 각각 97.75, -0.49, 1.96이었다.

가) 적정 소금량 결정을 위한 시험

(1) 배합비

배합 재료	배합비 1	배합비2	배합비3
소금	8.0 g	10.0 g	12.0 g
glutamate	0.3 g	0.3 g	0.3 g
설탕	6.0 g	6.0 g	6.0 g
물	85.7 g	84.0 g	81.7 g
총량	100 g	100 g	100 g

(2) 소금 첨가량에 따른 후리가게 base의 관능검사 및 색도

검사 항목		배합비1	배합비2	배합비3
맛	짠맛	적당	짜다	매우짜다
	단맛	약하다	약하다	약하다
	glutamate 맛	약하다	약하다	약하다
향		모두 배초향 고유의 향이 난다.		
색	L	40.32	41.61	41.39
	a	-3.05	-4.15	-3.82
	b	6.19	7.16	7.77

Glutamate의 양과 설탕의 첨가량은 고정시키고 소금의 첨가량에 변화를 주어 관능검사를 한 결과 배합비 2가 후리가게에 적합한 적당한 짠맛을 나타내고 배초향 고유의 맛과 향도 적절하여 소금의 첨가량은 배합비 2의 10.0 g으로 결정하였다. 색도는 소금의 첨가량이 증가할수록 명도와 황색도에 있어서 약간 증가하는 것으로 나타났으며 육안으로도 배합비 3이 배합비 1, 2보다 약간 밝은 녹색을 나타내었으나 큰 차이는 없었다. 이는 소금의 양이 증가할수록 건조시 갈변이 억제되는 것으로 판단된다. 향은 모두 배초향 고유의 향을 그대로 유지하고 있었다.

나) 적정 glutamate량 결정 시험

(1) 배합비

배합 재료	배합비 4	배합비5	배합비6
소금	10.0 g	10.0 g	10.0 g
glutamate	0.1 g	0.3 g	0.5 g
설탕	6.0 g	6.0 g	6.0 g
물	83.9 g	83.7 g	83.5 g
총량	100 g	100 g	100 g

(2) Glutamate 량에 따른 후리가께 base의 관능검사 및 색도

검사 항목	배합비4	배합비5	배합비6
맛			
짠맛	짜다	짜다	짜다
단맛	약하다	약하다	약하다
glutamate 맛	매우 약하다	보통이다	강하다
향	모두 배초향 고유의 향이 난다		
색			
L	41.66	40.94	40.42
a	4.01	3.59	3.35
b	8.08	7.41	7.15

소금과 설탕의 첨가량을 고정시키고 glutamate의 첨가량을 달리하여 관능검사를 한 결과 첨가되는 glutamate의 량이 증가할수록 후리가께 base의 맛이 강하고 풍부해져서 배합비 6의 glutamate 첨가량이 배합비4, 5보다 관능적으로 우수한 것으로 나타났다. 그러나 glutamate를 0.7 g, 1.0 g으로 더 첨가했을 때는 좀 느끼한 미원맛이 느껴져 관능적으로 좋지 않게 평가되었다. 따라서 glutamate의 적정 첨가량은 배합비 6의 0.5 g으로 결정하였다. 색도에서는 glutamate의 첨가량이 증가할수록 명도, 적색도, 황색도 모두 조금씩 감소하였다.

다) 설탕량 결정

(1) 배합비

배합 재료	배합비 7	배합비8	배합비9
소금	10.0 g	10.0 g	10.0 g
glutamate	0.5 g	0.5 g	0.5 g
설탕	8.0 g	10.0 g	12.0 g
물	81.7 g	79.7 g	77.7 g
총량	100 g	100 g	100 g

(2) 설탕 첨가량에 따른 후리가게 base의 관능검사 및 색도

검사 항목	배합비7	배합비8	배합비9
맛	짠맛	짜다	짜다
	단맛	약하다	적당하다
	glutamate 맛	보통	보통
향	모두 배초향 고유의 향이 난다		
색	L	41.96	42.26
	a	3.69	3.65
	b	7.53	7.15

설탕의 첨가량을 달리하여 관능검사를 한 결과 배합비 7, 9의 설탕 함량은 단맛이 약하거나 너무 강하여 적당한 단맛을 보이는 배합비 8의 10.0 g을 최적 설탕 함량으로 결정하였다. 색도 및 향에 있어서는 각 배합비들 사이에 특별한 차이가 없었다.

라) 최적 당종류 결정 시험

앞에서 소금, glutamate, 설탕의 기본 함량에 대한 최적 배합비를 결정하였다. 여기서는 맛의 변화와 충치 예방이나 당뇨병 환자 등을 고려하여 솔비톨과 같은 기능성 당류의 사용을 시험해보기 위하여 당의 첨가량을 10g으로 고정시키고 여러 가지 당 종류를 혼합하여 배초향 후리가게 base를 제조하고 관능검사를 실시하였다.

배합비 10, 11은 단맛이 조금 부족하였고, 함수 결정 포도당과 솔비톨을 각각 5g씩 첨가한 배합비 12는 설탕만 10 g 첨가한 배합비 8에 비해서 단맛이 오래가고 강렬하여 좋긴 하지만 뒤에 약간의 짠맛과 쓴맛이 함께 느껴졌다. 이는 솔비톨이 너무 많이 첨가되었기 때문인 것으로 판단된다. 포도당 10 g을 첨가한 배합비 13이 적당한 단맛을 나타내었으나, 솔비톨의 흡습방지 효과와 충치 예방 및 당뇨병 환자에 대한 활용성 등의 장점을 고려하여, 함수 결정 포도당과 솔비톨의 비율이 7:3인 배합비 15를 최적의 당종류 배합비로 결정하였다. 배합

비15는 단맛의 강도나 느낌도 함수 결정 포도당만 사용한 배합비 13과 비슷한 것으로 나타났다.

(1) 배합비

	배합비 10	배합비11	배합비12	배합비13	배합비14	배합비15
소금	10.0 g	10.0 g	10.0 g	10.0 g	10.0 g	10.0 g
glutamate	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
당	설탕(5g)+ 포도당*(5g)	설탕(5g) +솔비롤(5g)	포도당(5g)+ 솔비롤(5g)	포도당 (10g)	솔비롤 (10g)	포도당(7g)+ 솔비롤(3g)
물	79.5 g	79.5 g	79.5 g	79.5 g	79.5 g	79.5 g
총량	100 g	100 g	100 g	100 g	100 g	100 g

* 함수 결정 포도당

(2) 당 종류에 따른 후리가게 base의 관능검사 및 색도

	배합비10	배합비11	배합비12	배합비13	배합비14	배합비15	
맛	짠맛	짜다	짜다	짜다	짜다	짜다	
	단맛	약하다	약하다	적당	적당	약하다	
	glutamate 맛	보통	보통	보통	보통	보통	
향	모두 배초향 고유의 향이 난다						
색	L	41.26	41.42	40.68	41.08	40.96	40.78
	a	3.25	3.48	3.18	3.49	3.26	3.30
	b	6.79	6.35	6.72	6.74	7.05	6.75

마) 배초향 잎의 적정 전처리법 결정 시험

후리가게 base 제조시 사용되는 배초향 잎을 40℃에서 열풍 건조된 잎, 동결 건조된 잎 그리고 4℃에 밀봉 보관한 잎으로 나누어 앞에서 결정한 배합비 15의 조미액에 침지하는 실험을 실시하여 배초향 생잎에 대한 수확 직후의 적

정 전처리법을 결정하고자 하였다. 앞의 최적조미액 배합비 15를 기준으로 하여 침지시 배합비 15는 40℃ 열풍건조된 잎, 배합비16은 동결건조된 잎, 배합비 17은 4℃에 밀봉 보관한 생잎을 사용하여 배초향 후리가게 base를 제조하여 보았다.

(1) 배합비 15, 16, 17

재료	함수 결정 포도당	술비율	소금	glutamate	물	데친* 배초향잎
g	7	3	10	0.5	79.5	100

* 80℃, 2% 염수에 1분 30초간 데친 배초향 잎

(2) 전처리된 배초향 잎에 따른 후리가게 base 의 관능검사 및 색도

검사 항목	배합비15 (40℃ 열풍건조한 잎)	배합비16 (동결건조한 잎)	배합비17 (4℃ 저장 생잎)
짠맛	짜다	짜다	짜다
맛	단맛	상큼한 단맛	상큼한 단맛
glutamate 맛	보통	보통	보통
향	약간의 cooking flavor	고유한 배초향 향	고유한 배초향 향
L	43.62	45.40	43.83
색	a	-3.11	-5.60
b	6.51	8.53	8.03

배합비 15,16,17로 제조한 배초향 후리가게 base 모두 적당한 짠맛과 상큼한 단맛을 나타내었다. 색도에 있어서는 명도, 적색도, 황색도 모두 동결건조

한 잎과 생잎을 사용한 배합비 16, 17이 열풍건조한 잎을 사용한 배합비 15와 약간의 차이를 보였다. 명도는 동결 건조한 잎을 사용한 배합비 16이 45.40으로 세 배합비 중 가장 높았고 열풍건조한 잎을 사용한 배합비 15가 43.62로 가장 낮았다. 4℃에서 저장중인 생잎을 사용한 배합비 17은 배합비 15보다 약간 높은 43.83의 명도를 보였다. 이는 배합비 15가 열풍건조에 의해 갈변이 일어났기 때문이며 배합비 16은 동결건조로 원래 배초향 잎의 색깔을 거의 그대로 유지하는 것으로 판단된다. 육안적인 관찰에서도 밝은 초록색을 띠는 배합비 16이 약간 어두운 초록색을 띠는 배합비 15와 차이를 조금 나타내었다. 향에 있어서도 열풍 건조한 잎을 사용한 배합비 15는 약간의 cooking flavor가 느껴지는데 비해서 배합비 16과 17은 배초향 고유의 신선한 향을 좀더 유지하고 있었다. 하지만 종합적으로 크게 비교할 때 3가지 방법으로 전처리된 배초향 잎을 사용한 배초향 후리가게 모두 관능적인 특성에는 큰 차이가 없었다. 동결 건조한 잎을 사용할 경우 제조비 부담이 문제가 될 수 있으므로 수확 직후 생잎을 사용하여 후리가게를 제조하는 것이 좋으나 처리시간 등이 여의치 않은 경우 생잎을 40℃에서 열풍 건조시켜 보관하면서 사용하는 것도 별 문제가 없는 것으로 생각된다. 따라서 본 시험에서는 후리가게 제조용 배초향 잎의 전처리는 40℃에서 열풍건조 시키는 것으로, 최종 침지용 조미액 배합비는 배합비 15로 결정하였다.

3-7-3. 배초향 후리가게 부재료 제조 및 소재 가공

배초향 후리가게 제조에 사용되는 부재료로는 양념이나 조미식품 등에 이용되는 파, 김, 계란, 마늘, 고춧가루를 선정했으며 이들의 분말제조 및 배초향 후리가게 base의 분말제조는 다음과 같다.

가) 배초향 후리가게 base

60℃에서 3-4시간 동안 수분함량 6%내외로 열풍 건조시킨 배초향 후리가게 base를 18~20 mesh의 크기로 분쇄하였다.

나) 파 분말

파를 수세하여 적당한 크기로 절단하고 40℃에서 18시간 동안 수분함량 8.70%내외로 열풍 건조시킨 후 18~20 mesh의 크기로 분쇄하였다.

다) 김 분말

마른 김을 18~20 mesh의 크기로 분쇄하였다.

라) 계란 분말

끓는 물에서 10-20분간 계란을 완숙시켜 찬물에 급냉시켰다. 껍질을 벗긴 후 노른자위만 분리하여 18~20mesh의 크기로 40℃에서 5시간 동안 수분함량 3.35% 내외로 건조시켰다. 한편 상업적으로 시판되고 있는 난황 분말을 이용하여 약간의 수분을 가하여 위와 같은 크기로 재 성형한 뒤 다시 건조시켜서 사용하여도 좋다.

마) 마늘 분말

시판되고 있는 마쇄된 건조마늘(삼양, 100 %마늘)을 18~20mesh의 크기로 분쇄하여 사용하였다.

바) 고춧가루 분말

시판되고 있는 고춧가루(위생 청결 고춧가루100%, 사임당 식품)를 18~20 mesh의 크기로 분쇄하여 사용하였다.

배초향 후리가게 제조에 사용된 원, 부재료의 수분함량은 다음과 같다.

재료	배초향 후리가게 base	계란 노른자 분말	파 분말	김 분말	마늘 분말	고춧가루 분말
%	5.82	3.35	8.70	4.26	10.18	13.23

3-7-4. 용도별 배초향 후리가게 제품의 다양화

후리가게는 식품에 조미나 향신료 용도로 첨가하여 먹는 것이기 때문에 후리가게가 첨가되는 식품이 무엇이나에 따라서 후리가게의 제조에 들어가는 부재료도 특성에 적합하게 배합되어야 한다. 따라서 목적하는 식품을 밥이나 죽과 같은 조미가 안된 식품, 매운탕이나 찌개같은 얼큰한 조미 식품, 우동과 같이 조미는 되어 있으나 얼큰하지 않은 식품의 3가지로 나누어 각각에 맞는 부재료를 선정하고 다양한 배초향 후리가게를 제조하였다. 이때 들어간 배초향 후리가게 base는 위의 배합비 15로 만들었고 이때 사용되는 부재료로는 김 분말, 계란 노른자 분말, 마늘 분말, 파 분말, 고춧가루 분말 등으로 이들의 제조는 앞에서 설명한 방법으로 제조하였다.

가) 조미 안된 밥, 죽 등의 식품용 배초향 후리가게

원,부재료	배초향 후리가게 base	계란 노른자 분말	김 분말	총량
g	52	40	8	100

조미 안된 밥, 죽 등의 식품을 위한 후리가게에 들어가는 재료로는 배초향 후리가게 base, 김 분말, 계란 노른자 분말을 사용하였다. 배초향보다는 계란과 김으로 맛을 내는 것이 바람직한 것으로 관능평가되어 김과 계란 분말의 맛이 먼저 나고 배초향의 은은한 향이 뒷맛으로 남도록 위와 같은 배합을 실시하였다. 계란 노른자는 배초향과 김의 어두운 청록색과 잘 어울리도록 함량을 40%로 정하였고 김은 배초향 잎과 색깔에 있어서 차이가 없고 맛이 강해서 위의 함량과 같이 8%로 하는 것이 적당한 것으로 관능평가되었다.

나) 얼큰한 식품용 배초향 후리가게

원, 부재료	배초향 후리가게 base	파 분말	마늘 분말	총량
g	85	7.5	7.5	100

얼큰한 식품용 후리가게에 사용되는 재료로는 배초향잎, 파와 마늘을 사용하였다. 위의 배합은 향이 가장 중요한 것으로 관능평가되어 배초향의 향을 살려서 대상이 되는 식품의 얼큰한 맛에 상승효과를 주는 것이 주요 목적이고, 파와 마늘은 이미 대상식품에 들어가 있는 경우가 대부분이기 때문에 약간만 첨가하였다.

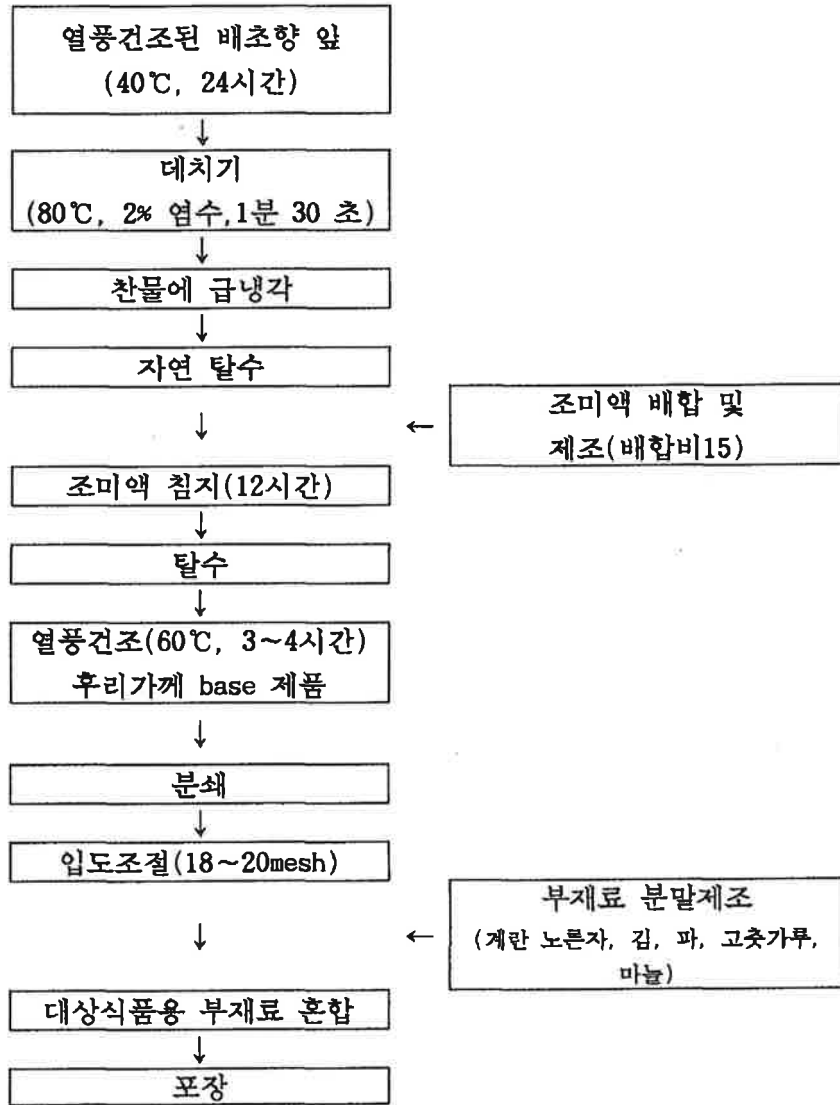
다) 얼큰하지 않은 식품용 배초향 후리가게

원, 부재료	배초향 후리가게 base	계란 노른자 분말	파 분말	김 분말	고춧가루 분말	총량
g	50	25	10	10	5	100

우동과 같이 얼큰하지 않은 식품에 첨가되는 후리가게 재료로는 배초향 잎, 김, 계란, 파, 고춧가루가 사용되었다. 위의 대상식품에는 김맛이 잘 어울리는 것으로 관능평가되어 김맛을 강하게 나타내기 위해 10%를 사용하였고 계란 노른자의 노란색과 고춧가루의 붉은 색이 시각적으로 잘 어울리도록 각각 25%와 5%로 배합하였다. 파는 향과 맛이 적당하게 우리나라도 10%로 배합하였다.

3-7-5. 배초향 후리가게 제조공정도

배초향을 이용한 후리가게 제품의 종합적인 최종 제조공정은 scheme 11과 같다.



Scheme 11. 배초향 후리가게의 제조공정도

제 4절 결 론

배초향을 다양한 기능성 식품으로 개발하기 위하여 배초향 추출물과 전초를 대상으로 수행한 연구 결과는 다음과 같다.

1. 기능성 음료 및 향신료로 개발에 필요한 배초향 추출물의 추출효율, 추출물 산도, 색도, 유리당 함량 분석 및 관능검사를 완료하였다.
2. 상기한 결를 토대로 기능성 음료의 시각 및 미각의 기호도와 저장성을 높일 수 있도록 당 및 산미료의 종류와 첨가량을 결정하였고, 부재료의 배합비를 결정하여 최종적으로 기능성 혼합음료, 과립차 및 탄산음료의 개발 공정을 확립하였다. 본 연구 결과를 특허출원 (출원명: 배초향 함유 음료 조성물 및 이의 제조방법, 특허출원번호 2001-25172)하였다.
3. 배초향 추출물을 이용한 향신료 개발 연구에서는 관능검사를 기준으로 용매별 추출 조건을 결정하였고 용도별 향신료 배합비를 결정하여 최종적으로 향신료 개발공정을 확립하였으며 본 연구결과를 특허출원 (출원명: 배초향 추출물 함유 향신료, 특허출원번호 2001-25217)하였다.
4. 배초향 전초를 이용한 식품 소재를 개발하기 위하여 부위별 조지방, 조단백질, 아미노산, 무기질 조성 등 기초성분 분석을 완료하였다.
5. 상기한 결과를 토대로 엽차 개발에 필요한 배초향 잎의 적정 볶음조건, 첨가량 및 추출조건 별 관능검사를 실시하였고, 혼합차 개발에 필요한 부재료 첨가량을 관능 검사를 통하여 결정하여 최종적인 엽차 및 혼합차 개발공정을 확립하였다. 본 연구 결과를 특허출원 (배초향 엽차 및 그의 제조방법, 특허출원번호 2001-25173)하였다.
6. 배초향 잎을 이용한 후리가게 개발 연구에서는 후리가게 base 제조에 필요한 침지시간, 소금, glutamate, 당 등 조미액의 배합비를 조사하였으며 이를 관능검사를 토대로 최적 배합비를 결정하였다. 후리가게 base를 이용한 용도별 제품 개발 공정을 완료하였으며 이를 특허출원 (특허명: 배초향 잎 함유 후리가게, 특허출원번호 2001-25216)하였다.